

**Timotein typpilannoituksen vaikutus syyskasvuun,
varastoyhdisteiden määrään ja talvehtimiseen**

Janne Korhonen
Maisterintutkielma
Helsingin yliopisto
Maataloustieteiden laitos
Kasvinviljelytiede 2018

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Maatalous-metsätieteellinen tiedekunta		Laitos — Institution — Department Maataloustieteiden laitos	
Tekijä — Författare — Author Janne Korhonen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Timotein typpilannoituksen vaikutus syyskasvuun, varastoyhdisteiden määrään ja talvehtimiseen			
Oppiaine — Läroämne — Subject Kasvinviljelytiede			
Työn laji — Arbetets art — Level Pro gradu		Aika — Datum — Month and year Toukokuu 2018	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 79 s.
<p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>Timotei (<i>Phleum pratense</i>, L.) on Pohjoismaiden viljellyin nurmiheinä, joka soveltuu hyvin boreaaliseen ilmastoomme erinomaisen talvenkestävyytensä vuoksi. Kykyyn talvehtia vaikuttaa syksyllä tapahtuvan kylmänkaraistumisen onnistuminen. Karaistumisen aikana timotein talvehtiviin versoihin varastoidaan suuria määriä liukoisia sokeri- ja pienikokoisia typpiyhdisteitä. Sokerit toimivat energiavarastoa talven aikana sekä jäätymistä estävinä yhdisteinä. Kylmäkaraistumisen aikana kasvit tuottavat erilaisia proteiineja ja muita typpiyhdisteitä, jotka vaikuttavat talvenkestävyyteen ja keväällä kasvuunlähtöön. Vegetatiivisten varastoproteiinien (VSP) rooli typpivarastoina on nurmilla vähän tutkittu aihe.</p> <p>Tutkimuksen tarkoituksena oli selvittää, miten kahden erilaisen timoteilajikkeen typpilannoitus vaikuttavat tyvien liukoisten sokereiden (WSC) ja liukoisten proteiinien määrään karaistumisen jälkeen syksyllä ja ennen kasvuun lähtöä keväällä. Tutkimuksessa tehtiin myös kasvustohavaintoja, joiden avulla selvitettiin lajikkeen ja typpitason vaikutusta talvehtimiseen ja kevätkasvuun. Peltokokeet suoritettiin LUKE:n tutkimusasemilla Maaningalla ja Ruukissa. Käytetyt timoteilajikkeet olivat Nuutti ja Grindstad. Typpilannoitustasot olivat 150, 250, 350- ja 450 kg N/ha.</p> <p>Timoteilajikkeiden syyskasvu ei eronnut toisistaan, mutta Nuutti varastoi määrällisesti enemmän sokereita talvea varten, johtuen osin tyvien suuremmasta kuivapainosta. Liukoisten proteiinien ja kokonaistypen määrä oli selvästi suurempi Nuutilla. Typpilannoitus lisäsi koeruutujen talvituhoja 250 kg N/ha lannoitusmäärästä ylöspäin. Keväällä liukoisten sokereiden määrä oli noin puolet syksyn tasosta, kokonaistypen ja proteiinien määrä oli lisääntynyt moninkertaisesti syksystä. Typpi ei vaikuttanut negatiivisesti timotein tyvien lukumäärään keväällä. Syksyn näytteistä tehdyn geelielektroforeesin perusteella löydettiin potentiaalisia polypeptidiketjuja, jotka voivat liittyä VSP- tai kylmästressiproteiinien synteesiin.</p> <p>Tulosten perusteella typpi vaikutti positiivisesti liukoisten sokereiden määrään typpilannoitustasolle 350 kg N/ha asti. Erityisesti keväällä typpi vaikutti positiivisesti kokonaistypen ja liukoisten proteiinien määrään, mikä saattaa edistää kevätkasvua. Lisäksi kuolleiden tyvien määrä väheni keväällä typpilannoituksen myötä ja elävien tyvien määrä oli keväällä riippumaton typpilannoituksesta. Vegetatiivisten varastoproteiinien rooli typpiyhdisteiden kerryttämisessä jää mahdollisten jatkotutkimusten selvitettäväksi.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords tyvisipuli, kylmänkaraistuminen, VSP, liukoiset sokerit, typpilannoitus			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Maataloustieteiden laitos			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Työn ohjasivat MMT Mervi Seppänen (HY) ja MMT Perttu Virkajärvi (LUKE)			

HELSINGIN YLIOPISTO — HELSINGFORS UNIVERSITET — UNIVERSITY OF HELSINKI

Tiedekunta/Osasto — Fakultet/Sektion — Faculty Faculty of Agriculture and Forestry		Laitos — Institution — Department Department of Agricultural Sciences	
Tekijä — Författare — Author Janne Korhonen			
Työn nimi — Arbetets titel — Title Nitrogen fertilization of timothy grass and its effects on autumn growth, amount of storage compounds and winter hardiness			
Oppiaine — Läroämne — Subject Crop Science			
Työn laji — Arbetets art — Level Master's thesis		Aika — Datum — Month and year May 2018	Sivumäärä — Sidoantal — Number of pages 79 p.
<p>Tiivistelmä — Referat — Abstract</p> <p>Timothy (<i>Phleum pretense</i>, L.) is the most widely grown grass species in Nordic countries and is well adapted for boreal climate because of its excellent winter hardiness. Adequate cold hardening in autumn is required for successful overwintering. During cold hardening large quantities of soluble sugars and low molecular nitrogenous compounds accumulate in stem bases. Soluble sugars are used during winter for energy and they also act as cryoprotectants. Nitrogenous compounds are involved in protein synthesis during cold acclimation as well as act as N-storage during regrowth. Among grasses, the role of vegetative storage proteins (VSP) as a long-term N-storage is under lesser research.</p> <p>The aim of this study was to investigate how N-fertilization effect growth, the amount of soluble sugars (WSC) and soluble proteins in timothy stem bases during cold hardening in late autumn and before regrowth in spring. Field experiments were conducted in LUKE research stations at Maaninka and Ruukki. Two timothy varieties, Nuutti and Grindstad with four different N-levels, ranging from 150- to 450 kg N/ha, were used.</p> <p>The autumn growth didn't differ significantly between varieties, however, Nuutti accumulated more soluble sugars mainly due to its larger stem bases. The amount of soluble proteins and total nitrogen were significantly higher in Nuutti. N-fertilizing increased winter damage when more than 250 kg N/ha was applied. The amount of soluble sugars decreased approx. 50 % during winter whereas the amounts of total nitrogen and soluble proteins increased. Nitrogen didn't have a negative effect on the amount of living stem bases in spring. SDS-PAGE-results showed a few potential polypeptide chains that might be related to VSP- or cold stress protein synthesis in autumn.</p> <p>Nitrogen had a positive effect on the amount of soluble sugars up to application of 350 kg N/ha. Nitrogen had a positive effect on the amount of total nitrogen and soluble proteins especially in spring. Those results might indicate better spring growth. The number of dead stem bases was lower on higher N-levels in spring and the number of living stem bases in spring was insignificant of N-level or variety. The role of VSP as a N-storage could not be clarified in this experiment.</p>			
Avainsanat — Nyckelord — Keywords haplocorm, cold hardening, VSP, soluble sugars, N-fertilizing			
Säilytyspaikka — Förvaringsställe — Where deposited Department of Agricultural Sciences and Viikki Campus Library			
Muita tietoja — Övriga uppgifter — Further information Supervisors: PhD Mervi Seppänen (UH), PhD Perttu Virkajärvi (LUKE)			

Sisällys

1 Johdanto.....	6
2 Timotei	7
2.1 Timotei viljelykasvina.....	7
2.2 Timotein suvuton lisääntyminen ja tyvisipuleiden kehittyminen	8
3. Typen metabolia nurmilla	9
3.1 Typen otto	9
3.2 Nitraattitypen pelkistys ja varastointi.....	11
3.3 Varastoproteiinien synteesi ja pitkäaikainen varastointi.....	12
3.5 Typpi ja nurmien talvehtiminen	14
4 Nurmiheinien varastohiilihydraatit.....	14
4.1 Hiilihydraattien luokittelu	14
4.2 Fruktaanisynteesi, varastointi ja mobilisaatio	16
5 Nurmiheinien kylmänkestävyys.....	17
5.1 Kylmänkestävyyden fysiologiaa	17
5.2 Kylmänkaraistumisen perusta nurmiheinillä	19
5.3 Fysiologiset ja biokemialliset muutokset karaistumisessa.....	19
6 Kylmästressin proteiinit	20
6.1 Lämpöshokkiproteiinit	21
6.2 Dehytriinit	21
6.3 Jäätymisenestoproteiinit.....	22
7 Vegetatiiviset varastoproteiinit (VSP).....	23
8 Liukoiset sokerit ja kylmästressi	25
8.1 Liukoiset sokerit ja kylmänkaraistuminen	25
8.2 Fruktaanit talvehtimisessa ja kevätkasvussa	25
8 Tutkielman tavoitteet.....	26
9 Aineisto ja menetelmät	27
9.1 Peltokokeen koejärjestely.....	27
9.3 Versotiheysmittaukset	29
9.4 Tyvinäytteiden otto ja käsittely	29
9.5 Tyvinäytteiden jatkokäsittely	31
9.6 Vesiliukoisten sokerien määrittäminen Nelson-Somogyi-menetelmällä	32
9.7 Typpi- ja proteiininanalyysit	32
9.7.1 Kokonaistypen analysointi	32
9.7.2 Liukoisten proteiinien analysointi.....	32
9.8 Tilastolliset analyysit ja menetelmät	34

10 Tulokset	35
10.1 Koevuosien 2016-2017 sääolot	35
10.2 Kasvuston korkeus, versotiheys ja kuiva-aine neliömetrillä	38
10.3 Elävien tyvien lukumäärä, kuolleiden tyvien osuus ja kuivapaino	39
10.4 Talvituhot	41
10.5 Vesiliukoiset sokerit	42
10.6 Tyvien kokonaistyyppi	45
10.7 Liukoiset proteiinit	48
10.8 SDS-PAGE	50
11 Tulosten tarkastelu	53
11.1 Sääolosuhteet	53
11.2 Kasvuston korkeus, versotiheys ja kuivamassa neliömetrillä	53
11.3 Elävien tyvien lukumäärä, kuolleiden tyvien osuus ja niiden kuivapaino	55
11.4 Talvituhot	56
11.5 Vesiliukoiset sokerit	57
11.6 Tyvien kokonaistyyppi	58
11.7 Liukoiset proteiinit	59
11.8 SDS-PAGE	60
12 Johtopäätökset	61
13 Kiitokset	63
14 Lähteet	63
15 Liitteet	76

1 Johdanto

Vuonna 2016 Suomen peltopinta-alasta noin 30 prosenttia (685 000 hehtaaria) oli nurmiin luettavaa peltoa (LUKE 2017). Suomessa nurmiviljelyn perustana ovat timotein (*Phleum Pratense* L.) ja nurminadan (*Festuca pratensis* Huds.) erilaiset seokset. Timotei on Pohjoismaiden eniten viljelty nurmiheinälaji ja se on tunnettu erinomaisesta talvenkestävyydestään, minkä vuoksi se soveltuu hyvin boreaalisen vyöhykkeen alueelle. (Höglind ym. 2001). Timoteivaltaisia nurmikasvustoja niitetään säilörehuksi Suomessa 2–3 kertaa kasvukauden aikana, vuoden sääoloista ja lajikkeesta riippuen. Varsinkin lajikejalostuksen keinoin on pystytty lisäämään timotein satoisuutta ja parantamaan jälleenkasvua (Lemettinen ym. 2012). Timotein kasvuun ja talvehtimiseen vaikuttaa kasvukauden sääolojen lisäksi lajikeominaisuudet sekä kasvukauden viljelytoimenpiteet, erityisesti lannoitus.

Typpi on nurmikasveille tärkein sadonmuodostukseen vaikuttava ravinne; se on proteiinien, amino- ja nukleiinihappojen sekä monien muiden kasvien elintoimintoihin tarvittavien yhdisteiden tärkeä ainesosa. Typen puutos ilmenee kasveissa aluksi vaivalloisena kasvuna sekä vanhojen lehtien kloroosina (Taiz ja Zeiger 2010). Kroonisen typenpuutteen seurauksena nurmien versot jäävät pieniksi, sivuversonta heikkenee ja verso-juuri-suhde laskee (Hawkesford ym. 2012). Monivuotisten nurmiheinien kuten timotein kyky selvitä talvesta ja jälleenkasvaa keväällä perustuu paljon kasvien varastointien yhdisteiden kuten liukoisten sokerien määrään. Lauhkean vyöhykkeen nurmiheinät kerryttävät syksyllä suuria määriä sokereita, joista kvantitatiivisesti mitattuna suurin ryhmä ovat fruktaanit (Pollock ja Jones 1979; Halling 1988; Tronsmo ym. 1993). Sokerien lisäksi monet nurmiheinät syntetisoivat runsaasti myös aminohappoja ja liukoisia proteiineja ennen talven tuloa. Käytännössä tämä tarkoittaa syksyllä orgaanisten typpiyhdisteiden siirtämistä ei-talvehtivasta ja kuolevasta lehtimateriaalista versojen, rönsyjen ja juurien talvehtiviin varastosolukoihin. Nurmihienien talvehtivien osien typpipitoisuus tukee kevätkasvua (Volenc ym. 1996; Gloser 2005) ja varasto-osien typpipitoisuus saattaa korreloida negatiivisesti talvituhojen kanssa (Volenc ym. 1996). Lainsäädännöllä peltokasvien typpilannoitusta ohjataan Euroopan unionin nitraattidirektiivin (VN 2014) sekä ympäristökorvauksen

lannoitusrajoitusten ja sen lohkokohtaiset toimenpiteiden kautta (Mavi 2018), joita on sovellettu kansallisella tasolla suomalaisen maanviljelyn olosuhteisiin.

2 Timotei

2.1 Timotei viljelykasvina

Timotein suosio nurmiviljelyssä perustuu sen hyvään maittavuuteen karjalle, viljelyvarmuuteen ja soveltuvuuteen seosviljelyyn muiden nurmi- tai palkokasvien kanssa. Timotein suurimmaksi heikkoudeksi voidaan mainita sen verrattain hidas jälkikasvu (Höglind ym. 2001). Timotei voidaan jakaa alkuperänsä mukaan pohjoisiin- ja eteläisiin genotyyppeihin. Lajike-erot tulevaan esiin yleensä jälleenkasvukyvyssä sekä talvenkestävyydessä. Pohjoiset genotyypit yleensä mielletään talvenkestävimmiksi, mutta niiden jälleenkasvu on hitaampaa kuin eteläisillä genotyypeillä (Rognli 1987). Timotei on pitkän päivän kasvi, jonka kukintainduktio käynnistyy päivänpituuden ollessa yli 12 tuntia, tosin kriittinen päivänpituusvaatimus vaihtelee eri genotyyppien välillä (Hay 1990; Heide 1982). Monista muista nurmiheinistä poiketen timotei ei yleensä vaadi kylmälle altistamista (vernalisaatiota) kukkiakseen, vaan riittävän pitkä valojakso itsessään virittää kukintainduktion. Timoteilla vernalisaation on kuitenkin havaittu nopeuttavan kevätkasvua erityisesti pohjoisilla genotyypeillä (Seppänen ym. 2010). Timotein versojen kasvukorkeus vaihtelee 20–150 cm välillä lajikkeesta ja kasvuympäristöstä riippuen, lehdet ovat varsin kookkaita, 3–10 mm leveitä. Timotein juuristo puolestaan ulottuu lähinnä peltomaan muokkauskerroksen, vaikkakin yksittäiset jälkijuuret voivat kasvualustasta riippuen ulottua jopa 120 cm syvyyteen (Berg ym. 1996).

Timotein versot voidaan kehitysvaiheen perusteella luokitella kolmeen erilaiseen versotyyppiin: vegetatiivisiin, (VEG), elongoituviin (ELONG) ja generatiivisiin versoihin (GEN). Vegetatiivisen version kärkikasvupiste on erilaistumaton ja se tuottaa vain uusia lehtiaihteita eikä muodosta vielä aitokortta (pseudokorsi). Kasvupiste sijaitsee VEG-versoissa lähellä maanpinnan tasoa, minkä vuoksi niitto tai laidunnus kohdistuu kasvupisteen yläpuoliseen lehtibiomassaan, mikä mahdollistaa niitetyn version uudelleenkasvun. Generatiivisissa versoissa jo erilaistunut kasvupiste on puolestaan siirtynyt lehtitupen sisällä kohti version kärkeä ja tuottaa suvullisia kukka-aihteita, joihin muodostuu timotein tähkä. Timotei on kasvutavaltaan poikkeuksellinen muihin

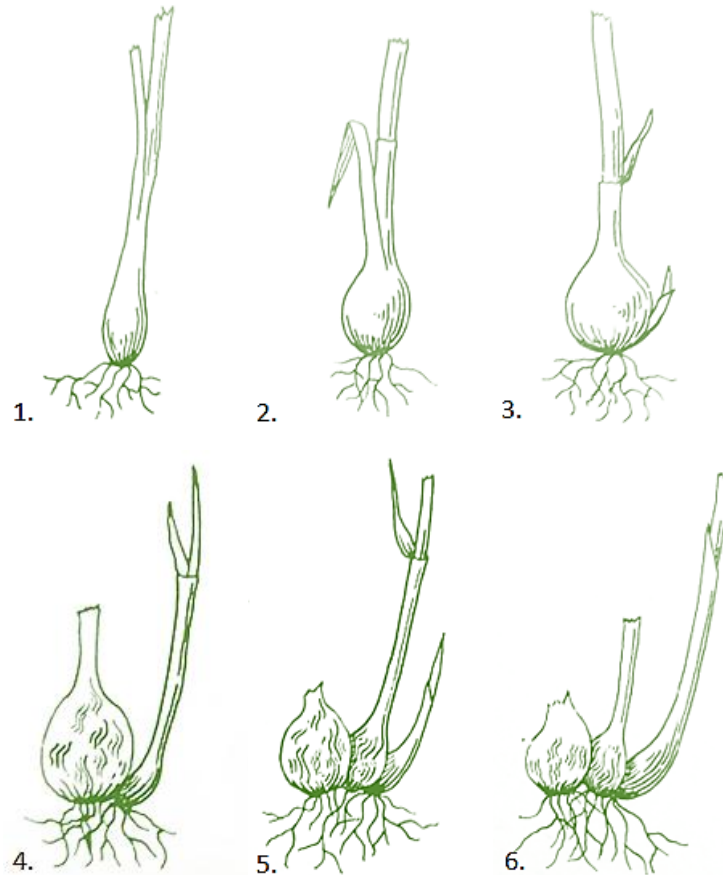
nurmiheiniin nähden, sillä se kykenee tuottamaan aitokorrellista versoa, vaikka kasvupiste olisikin vegetatiivinen. Tällaisia versoja kutsutaan vegetatiivisesti elongoituviksi (ELONG) versoiksi (Virkajärvi ja Pakarinen 2012). Timotei siirtyy generatiiviseen kasvuvaiheeseen, kun versoon on muodostunut vähintään viisi lehteä (Höglind ym. 2001). Kuten muillakin nurmikasveilla myös timoteilla populaatioiden kehitys on dynaamista, sisältäen aina eri kasvuvaiheissa olevia versoja, joiden osuus vaihtelee eri satojen välillä (Virkajärvi ja Pakarinen 2012).

2.2 Timotein suvuton lisääntyminen ja tyvisipuleiden kehittyminen

Klassinen tapa kuvailla timotein versonmuodostusta perustuu sen sivuversontaan, mikä on timotein vegetatiivisen lisääntymisen perusta (Sheard 1968a; Marjanen ja Soini 1979). Timotein primääriversolla tarkoitetaan versoa, joka on kehittynyt siemenestä. Kasvu voi myös jatkua edellisen vuoden talvehtivista versoista, joita puolestaan kutsutaan sekundääri- tai tertiääriversoiksi (kuva 1). Tertiääriversot ovat monivuotisen timotein suurin talvehtiva yksikkö. Timotein jatkuva sadonmuodostus kasvukauden aikana perustuu vegetatiiviseen lisääntymiseen sekundäärisen versonmuodostuksen kautta, joka saa alkunsa primääriversojen tyvi- eli sivusilmuista. Sekundääriversojen muodostuessa, vanha primääriverso kuolee vähitellen pois. Sekundääriversojen sivusilmuista taas muodostuu loppukesän/syksyn aikana talvehtivia tertiääriversoja (Sheard 1968a; Marjanen ja Soini 1979). Perustamisvuonna timotein talvehtivien versojen lukumäärä riippuu kylvöajankohdasta; keväällä kylvetty timotei ehtii ennen talvea muodostamaan sekundääri- tai tertiääriverson. Myöhään kylvetty timotei puolestaan muodostaa talvea vasten ainoastaan pääversion (primääriverson), niin sanotun hauenhampaan (Marjanen ja Soini 1979). Primääriset vegetatiiviset versot muodostavat timotein ensimmäisen sadon, sekundääriset ja tertiääriset toisen ja kolmannen (kuva 1).

Timotein versojen kehitysrytmi on sidottu tyvisipulien eli haplokormien kehitykseen. Kun primäärisestä tyvisipulista (pääversion tyvi) muodostuu sivuversoja, ne alkavat kehittyä omiksi itsenäisiksi yksiköikseen muodostamalla uusia tyvisipuleita, jotka juurtuvat maahan. Näitä sivuversion muodostamia tyviä puolestaan kutsutaan sekundääriseksi tyvisipuleiksi. Syksyllä sekä primäärinen että sekundäärinen tyviverso voivat olla eläviä, mutta sekundääristen tyvien muodostamat tertiääriversot ovat yleensä talvehtivia osia (kuva 1). Tyvisipuli toimii timoteille varastorakenteena, johon kertyy

syksyllä erityisesti vesiliukoista fruktaania (Suzuki 1968) ja liukoisia typpiyhdisteitä, kuten proteiineja (Mino ja Satake 1978).



Kuva 1. Timotein versotyypit ja niiden muodostuminen kasvukauden aikana. 1. Primääriverso, joka on muodostunut kylvövuonna tai edellisen vuoden tertiääriversosta. 2. Primäärisen version kehitys ensimmäiseen nurmisatoon. 3–4. Sekundääristen versojen muodostuminen primääriverson tyvi- eli sivusilmuista (solmun ylä- ja alapuoli). Näistä versoista muodostuu timotein toinen ja kolmas sato. 5. Primäärinen verso ja sen tyvisipuli on käytännössä jo rappeutunut pois, talvehtivan tertiääriverson muodostus alkaa sekundääriverson tyvisipulista. 6. Sekundääriverso on rappeutunut pois ja tertiääriverso on muodostunut talvehtimaan. Muokattu Sheard (1968a) mukaan lähteestä Sheard (1968a).

3. Typen metabolia nurmilla

3.1 Typen otto

Typen osuus kasvien elävän kudoksen kuivamassasta vaihtelee 1–5 prosentin välillä (Whitehead 1995) ja kaikista mineraaliravinteista typpi on kvantitatiivisesti mitattuna tärkein ravinne kasvien kasvuun ja kehitykseen (Engels ja Marschner 1995). Typpi on tärkeä proteiinien, aminohappojen ja klorofyllin rakenneosa ja se voidaan luokitella sitoutumistapansa puolesta erilaisiin ryhmiin, kuten metabolisesti aktiiviseksi tai varastotyyppi (Whitehead 1995). Kasvit ottavat juurillaan maaperän typen lähinnä

epäorgaanisten nitraattisuolojen (NO_3^-) - tai ammoniumionien (NH_4^+) muodossa. Luonnon ruohikkoekosysteemeissä maaperän kaikesta typestä suurin osa on orgaanisessa muodossa ja suoraan kasveille käyttökelpoisia yhdisteitä muodostuu hitaasti maaperän hajotusreaktioiden tuotteina. Nitraattitypen otto vaatii aina energiaa, koska se tapahtuu ritsosfäärissä sähkökemiallista gradienttia vastaan. Ammoniumtypen otto tapahtuu kationinvaihdon avulla. Tiettyjen aminohappojen, amidien ja urean otto on juurien kautta mahdollista, mutta vähäistä. Typen kokonaisotosta yli 95 prosenttia tapahtuu juurien kautta (Whitehead 1995).

Lämpötila vaikuttaa mineraalitypen ottoon (Hawkesford ym. 2012) ja esimerkiksi nitraatin otto suhteessa ammoniumtyyppeen heikkenee merkittävästi lämpötilan laskiessa (Clarkson ja Warner 1979; Below 2002). Clarkson ym. (1986) havainnoivat, että ritsosfäärissä alle 9 °C lämpötilassa englanninraiheinä (*Lolium perenne* L.) otti kaikesta typestään 85 prosenttia ammoniumtyypenä, 17 °C lämpötilassa vastaava osuus oli 60 prosenttia. Clarkson ja Warner (1979) saivat samankaltaisia tuloksia myös italianraiheinällä. Typen oton heikentyminen matalassa lämpötilassa vaikuttaa myös nitraatin pelkistämiseen ja siten osaltaan inhiboi nitraattitypen ottoa. Matala lämpötila heikentää nitrifikaatiota, mikä puolestaan myös lisää suhteessa ammoniumtypen ottoa (Below 2002). Valo vaikuttaa merkittävästi typen ottoon ja sen assimilaatioon; alhainen valon intensiteetti vähentää nitraattitypen ottoa, lisää sen kerryttämistä solukkoihin ja hillitsee pelkistysentsyymien toimintaa (Below 2002). Päivänpituuden on huomattu vaikuttavan muun muassa timotein nitraattipitoisuuteen ja lehtien typpisisältöön (Bakken 1992; Bakken 1998).

Typen kokonaisottoon vaikuttaa kasvukauden pituus sekä kasvuolosuhteet. Typen maksimiottoa on testattu paljon nurmikasveilla ja yleensä hieman yli 500 kilon kokonaistyyppimäärät ovat olleet mahdollisia. Wilman (1965) sai italianraiheinällä (*Lolium multiflorum*, Lam.) yhden päivän maksimiotoksi 7,5 kg N/ha päivässä, kun lannoituksesta oli aikaa 14–21 vuorokautta. Tyypillinen päivän otto on noin 1–3 kg N / ha. Suomalaisissa nurmitutkimuksissa biologisesti optimi typpilannoituksen määrä on ollut nurmille keskimäärin 350 kg N / ha ja orgaanisilla mailla 335 kg N / ha (Salo ym. 2013).

Typenottoa kasveissa säätelee ensisijaisesti sen saatavuus maaperässä, mutta hyvin paljon myös kasvien kuljetussysteemien aktiivisuus. Koska kasvien lehdet ovat typen assimilaation suurin kohde, fotosynteesin taso vaikuttaa typen ottoon eniten. Typpi puolestaan kasvattaa yhteyttämistuotteita tuottavien lähteiden kokoa ja lisää nettofotosynteesin kokonaismäärää (Engels ja Marschner 1995). C3-yhteyttävät nurmiheinät vaativat enemmän typpeä kuin C4-yhteyttävät, mikä liittyy erilaiseen fysiologiaan; C4-heinien fotosynteesissä hiilidioksidia sitoo typpipitoisen ribuloosi-1,5-bifosfaattikarboksylaasin eli Rubiscon lisäksi PEP-karboksylaasi, joka korvaa osittain typpipitoisen Rubiscon. C3-kasveilla typpi lisää solujakautumista lehtien kasvullisissa osissa ja nopeuttaa esimerkiksi lehtien laajenemista (Gastal ja Durand 2000). Suurin osa C3-kasvien lehtien tyypestä on sitoutunut Calvinin kierron proteiineihin ja yhteyttämiskalvostoihin eli tylakoideihin. Typen oton lisääntyessä tylakoideihin sitoutuvan typen osuus pysyy usein suhteessa samana ja liukoisten proteiinien määrä kasvaa (Evans 1989).

3.2 Nitraattitypen pelkistys ja varastointi

Kun kasvit ottavat juurillaan maanesteen nitraattia, niin osa siitä siirretään johtosolukon kautta varsiin ja lehtiin sellaisenaan, osa taas syntetisoidaan aminohapoiksi ja amideiksi ennen mahdollista vientiä varastosolukkoihin, kuten rönseyihin ja juuriin. Nitraattia voidaan oton jälkeen myös varastoida suoraan juuristoon. Kasvien ottama nitraatti pelkistetään nitraatti- ja nitriittireduktaasientsyymien (Nr) avulla ammonium-muotoon, joka vaatii niiltä myös paljon energiaa. Nitraatin pelkistys tapahtuu kasvilajista riippuen lehtien/juurten solujen solulimassa, jossa reaktiotuotteena syntyvä nitriitti kuljetetaan kloroplastin fotosysteemi I:een. Siellä nitriitti pelkistetään ammonium-muotoon. Nitraatin pelkistamisaktiivisuuteen vaikuttaa siten myös valon määrä; lehdissä sekä versoissa tapahtuva pelkistys heikkenee pimeässä (Pearson ym. 1981). Yleensä nitraattitypen kerryttäminen ja lyhytaikainen varastointi liittyvät kasvien vuorokausirytmieihin ja typen saatavuuden muutoksiin. Fotosynteesin heikentyessä tilapäisesti on edullisempaa varastoida ylimääräistä nitraattia lyhyeksi aikaa lehtien solukkoihin kuin pelkistää typpeä tehottomammin esimerkiksi juurissa. Lyhytaikainen typen kerryttäminen versoissa taas tukee kasvua siinä tilanteessa, kun typen otto juurien kautta heikkenee esimerkiksi nitraatin saatavuuden vuoksi (Chapin ym 1990). Tietyt kasvit myös säätelevät nitraatin avulla kationi-anioni-tasapainoaan (Hawkesford ym.

2012). Useilla monivuotisilla kasveilla lähes kaikki typpi pelkistetään ammoniummuotoon, kun kasvin ulkoinen nitraattikonsentraatio on alle yksi millimoolia (mM) (Hawkesford ym. 2012). Juurten nitraattipitoisuus on selvästi alhaisempi kuin versoissa (Darwinkel 1975), mutta pitoisuus juurissa kuitenkin nousee kasvin vanhetessa. Pitoisuuden nousu on seurausta nitraattireduktaasientsyymin aktiivisuuden heikkenemisestä. Hivenravinteista molybdeeni toimii Nr-entsyymin yhtenä koentsyyminä elektroninsiirtoketjussa, minkä puute saattaa heikentää typen ottoa ja assimilaatiota (Meyer ja Stitt 2001).

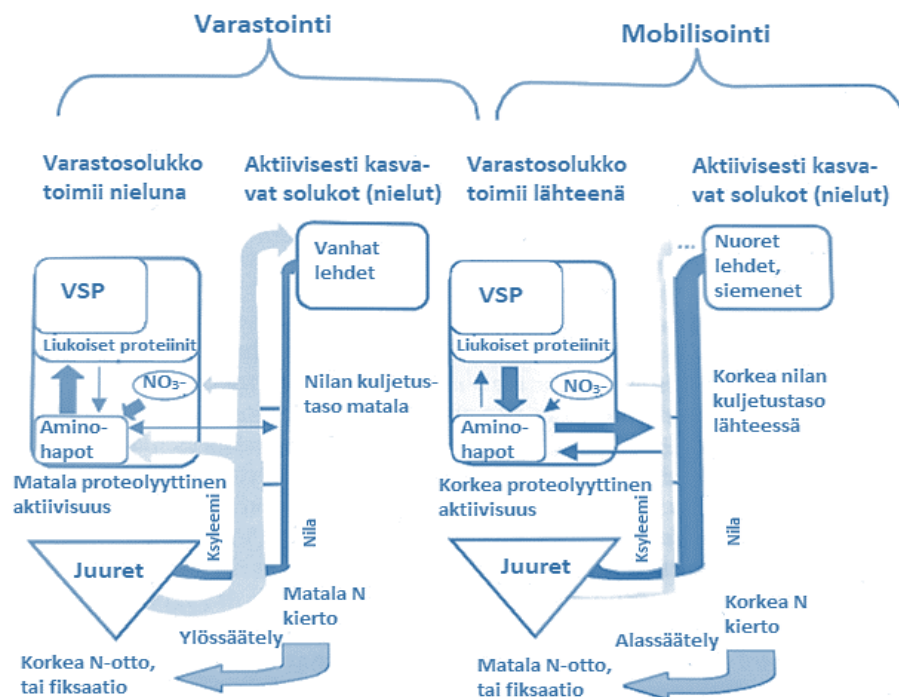
3.3 Varastoproteiinien synteesi ja pitkäaikainen varastointi

Nitriitin pelkistyksen jälkeen ammoniumtyppi syntetisoidaan glutamiini- ja glutamaattisynteesien kautta aminohapoiksi, mikä vaatii valon lisäksi hiilihydraatteja glutamiinin ja glutamaatin hiilirunkojen muodostamiseksi (Meyer ja Stitt 2001). Aminohappoja voidaan nitraatin tavoin varastoida lyhyitä aikoja solujen vakuoleissa, joissa aminohapot ovat suurimmaksi osaksi glutamiinia ja aspargiiniä. Myös aminohappojen pitkäaikainen varastointi on mahdollista, jolloin varasto koostuu suurimmaksi osaksi aspargiinistä, glutamiinista, glutamaatista ja proliinista. Pitkäaikainen varastointi kuitenkin eniten perustuu liukoisten proteiinein synteisiin ja hajottamiseen (Delrot ym. 2000). Kasvien proteiinisynteesissä voidaan ylläpitoproteiinien lisäksi tuottaa varastoproteiineja, joiden synteesi- ja sijoituspaikat ovat yleisimmin talvehtivat varastosolukot kuten versojen juurenniska, juuret ja rönsyt sekä siemenet. Jotta varastoproteiineja ei hydrolysoitaisi liian aikaisin kasvien käyttöön, niitä pystytään suojamaan erilaisilla mekanismeilla. Näistä tärkein on proteiinien sitominen varastosoluelimiin, jolloin proteiinien mekaaninen rakenne muuttuu. Synteesi tapahtuu karkean solulimakalvoston ribosomeissa, jonka jälkeen proteiini siirretään joko suoraan varastoon vakuoleihin tai edelleen muokattavaksi Golgin laitteeseen glykoproteiinien rakentamista varten (Müntz 1998).

C3-kasveilla versojen typpivarastoista 15–35 prosenttia on sitoutunut Rubiscoon ja sen osuus liukoisten proteiinien kokonaismäärästä vaihtelee 30–60 prosentin välillä. Rubiscolla on siten suuri merkitys typpivarastojen kierrättämisessä (Hirel ja Gallais 2006). Liukoisiin proteiineihin luokitellaan myös vegetatiiviset varastoproteiinit, joiden synteesi tapahtuu kaksi- ja monivuotisilla kasveilla yleensä kausittaisesti ja voi liittyä

kasvien karaistumisprosesseihin (Delrot ym. 2001, Ourry ym. 2001). Nämä proteiinit syntetisoidaan muiden varastoproteiinien tavoin, mutta ne eivät kuulu samaan perheeseen siementen varastoproteiinien kanssa (Müntz 1998). Vegetatiivisista varastoproteiineista kerrotaan enemmän kappaleessa seitsemän.

Aminohappojen varastointi, remobilisaatio ja kuljetus mahdollistavat pelkistetyn typen sisäisen kierrättämisen tilanteissa, joissa typen otto on heikkoa tai estynyt (Delrot ym. 2000). Kasvien kohdatessa typen puutetta, ne siirtävät varastotyyppiä juurista ja vanhemmista lehdistä nuoriin kasvulehtiin. Varastotyyppiä mobilisoitaessa aminohappoihin sitoutunut typpi siirretään ensin ja lähtösolukko tyhjenee siitä lähes kokonaan. Liukoiset varastoproteiinit hydrolysoidaan aminotyypeksi ennen siirtoa nieluihin ja lähtösolukko tyhjenee varastoproteiineista yleensä vain osittain (Ourry ym. 2001). Myös puhdas nitraatti muokataan aminohapoiksi ennen siirtoa (Whitehead 1995; Ourry ym. 2001). Typen kerryttäminen varastosolukkoihin syksyllä perustuu kuljetukseen kuolevasta lehti/versomateriaalista sekä jäänestoaineina toimivien tyyppiyhdisteiden synteesiin, esimerkiksi proliinin tuotantoon. Tyyppivarastojen kokoon vaikuttavat myös maaperässä olevan labiilin typen määrä ja typen oton taso suhteessa sen assimilaatioon kasveissa (Gloser 2005).



Kuva 2. Typen kuljetus monivuotisissa kasveissa varastoinnin (vasen) ja mobilisaation (oikea) aikana. Varastoinnin aikana tyyppiä syntetisoidaan lyhyt- ja pitkäaikaiseen muotoon aminohappoina ja liukoisina proteiineina. Mobilisaation vaihe kuvaa hyvin kevätkasvun

tilannetta, jossa varastosolukon proteiineja hydrolysoidaan aminohapoiksi ja siirretään aktiivisesti kasvaviin solukoihin. Typen otto juurien kautta on tällöin vielä estynyt tai heikkoa. Muokattu Ourry ym. (2001) mukaan lähteestä Ourry ym. (2001).

3.5 Typpi ja nurmien talvehtiminen

Liiallista nurmien ja syysviljojen typpilannoitusta syksyllä on pidetty haitallisena talvehtimiselle ja kylmänkestävyydelle, koska typpi lisää rehevää kasvua ja typen allokaatiota lehtimateriaaliin. Tätä pidetään haitallisena tilanteessa, jossa kasvin tulisi valmistua talvehtimiseen (Marjanen ja Soini 1979; Levitt 1980). Runsas typen lisäys syksyllä altistaa myös kasvitaudeille, erityisesti lumihomeelle (Webster ja Ebdon 2005). Lisäksi kosteina syksyinä nitraattitypen huuhtoutuminen saattaa lisääntyä merkittävästi. Suomessa nurmiheinien talvituhot ovat lisääntyneet selvästi, kun kolmannelle sadolle typpeä on annettu yli 100 kg N / ha (Huokuna ja Hiivola 1974). Lähinnä nurmikkojen ja golfsenttien hoidossa myöhäisen typenlisäyksen on huomattu kuitenkin parantavan joidenkin nurmiheinien talvehtimistä ja kevätkasvua (Lloyd ym. 2011). Myöhäisellä typenlisäyksellä tarkoitetaan yleisesti ajankohtaa, jossa nurmien version kasvu on jo päättynyt ja kasvit kerryttävät varastoyhdisteitä talvehtiviin osiin (Kvalbein ja Aamlid 2012). Lannoitus kasvun loppuessa perustuu teoriaan, jonka mukaan typpi tukee varastoyhdisteiden kerryttämistä sekä juurten ja rönsyjen kehitystä (Lloyd ym. 2011; Kvalbein ja Aamlid 2012). Myöhäisessä lannoituksessa typenoton tehokkuus vaihtelee suuresti lannoituksen ajankohdasta, kasvilajista ja sääolosuhteista riippuen; esimerkiksi niittynurmikalla (*Poa pratensis* L.) typenoton tehokkuus (NUE, *Nitrogen use efficiency*) on ollut parhaimmillaan 35 % (Miltner ym. 1996) ja huonoimmillaan 18 % (Frank ym. 2006). Englanninraiheinällä myöhäisen typen lisäyksen ajankohta vaikutti talvituhojen määrään siten, että ennen version kasvun loppumista lisätty typpi nosti talvituhon suhteessa myöhempään lisäykseen, jossa versot eivät enää kasvaneet (Webster ja Ebdon 2005).

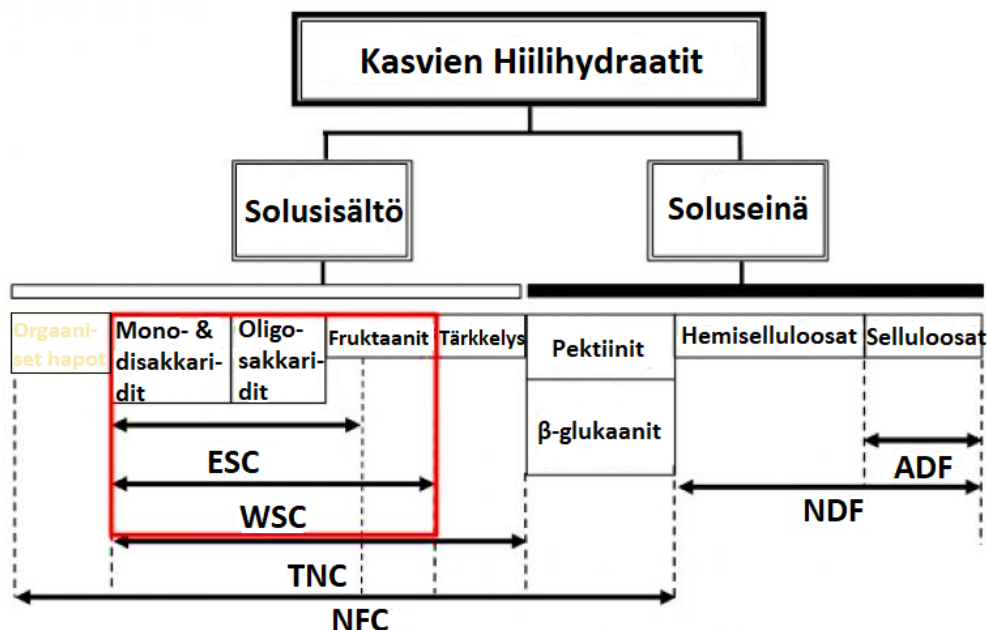
4 Nurmiheinien varastohiilihydraatit

4.1 Hiilihydraattien luokittelu

Nurmikasvien kuiva-aine koostuu noin 80 prosenttisesti erilaisista hiilihydraateista, joista suuri osa on erilaisia sokereita. Bertrand ym. (2008) mukaan varsinaisiin yksinkertaisimpiin kasvien tuottamiin sokereihin lasketaan glukoosi, fruktoosi,

sakkaroosi ja osa raffinoosista, joka on oligosakkaridi. Yksinkertaisimmat monosakkaridit glukoosi, galaktoosi ja fruktoosi muodostuvat fotosynteesin reaktiotuotteina, kuten myös disakkarideihin kuuluva sakkaroosi. Kasvisoluissa osa fotosynteesin sokereista syntetisoidaan suoraan fruktaaneiksi tai tärkkelykseksi ja varastoidaan soluihin, jotka toimivat sokerilähteinä kasvin muille osille, niin kutsutuille nieluille. Suurin osa sakkaroosista menee kasvin jatkuviin elintoimintoihin, yleensä lehtien ja varren kasvusolukoihin. Sokereita varastoidaan myös lehtituppiin, varren eri osiin ja juuriin. Kohdesoluissa nämä yksinkertaiset sokerit muovataan pitkäketjuisempiin muotoihin, joita kutsutaan yleisesti varastosokereiksi (Lewis 1984).

Solunsisäisesti varastoitavia sokereja voidaan luokitella niiden liukoisuuden mukaan. Etanolille liukoista sokereista käytetään termiä ESC (*ethanol soluble carbohydrates*), joihin kuuluu mono-, di- ja oligosakkaridit ja lyhytketjuiset fruktaanit (kuva 3.) Vesiliukoisiin sokereihin, WSC (*water-soluble carbohydrates*) kuuluvat edellisen ryhmän lisäksi myös kaikki fruktaanit. Vesiliukoiset sokerit ovat lauhkean vyöhykkeen nurmille tärkein varastosokereiden ryhmä, joita syntetisoidaan energiaksi solujen sytoplasmassa (Lewis 1984). Kaikkiin varastosokereihin, TNC (*total nonstructural carbohydrates*) lasketaan vesiliukoisten sokerien lisäksi tärkkelys (kuva 3) (Pollock 1986).



Kuva 3. Hiilihydraattien luokittelu niiden solusijainnin ja liukoisuuden mukaan. Muokattu Lewis (1984) mukaan lähteestä Dairyland Laboratories (2018).

4.2 Fruktaanisynteesi, varastointi ja mobilisaatio

Monivuotiset nurmiheinät jaotellaan kahteen kategoriaan perustuen siihen mitä oligo- ja polysakkarideja kasvit varastoivat vegetatiivisiin solukoihin. Trooppisten ja subtrooppisten alueiden nurmiheinät kerryttävät eniten tärkkelystä, joka on puhdas glukoosin polymeeri, esiintyen joko amyloosina tai amylopektiinä (Smith 1972). Tärkkelystä voidaan syntetisoida varastosolukkojen lisäksi myös kasvien lehtiin (Pollock 1986). Lauhkean vyöhykkeen nurmiheinät eivät puolestaan varastoi juurikaan tärkkelystä (Østrem ym. 2011). Sen sijaan ne kerryttävät pitkäketjuisista varastosokereista eniten fruktaaneja, fruktoosin polymeerejä, jotka syntetisoidaan sakkarooseista sukroosi-fruktosyltransferaasi-entsyymien (*SFT*) avulla. Entsyymeistä yleisin on *6-SFT*, jonka ilmeneminen on havaittu kaikista tutkituista ruohokasveista, eikä sitä löydy muista kasvikunnan suvuista (Wei ym. 2002). Fruktaanisynteesi ja fruktaanien kerryttäminen solujen vakuoleihin madaltaa sakkaroosin pitoisuutta, joka taas säätelee negatiivisesti fotosynteesiä (Pollock ja Cairns 1991).

Fruktaanisynteesi lehdissä on yleensä nopeaa tilanteessa jossa fotosynteesi tuottaa enemmän sakkaroosia, mitä kasvi pystyy hyödyntämään energia-aineenvaihdunnassaan. Lisäksi fruktaanien synteesiin osallistuvien entsyymien toiminta tehostuu matalissa lämpötiloissa esimerkiksi viljoilla ja nurmilla (Pollock ja Cairns 1991). Nurmiheinillä esiintyvät fruktaanit ovat β 2-6 glykosidisidoksilla linkittyneitä levaaneja. Fruktaanien polymerisoitumisaste on huomattavasti tärkkelystä alhaisempi (Smith 1972; Cairns ja Pollock 1988a), mutta eri fruktaanipolymeerin pituus vaihtelee paljon eri lajien välillä; esimerkiksi rehukattaran (*Bromus inermis*, L.) verson tyvestä mitattu polymerisoitumisaste oli 26 monomeeriyksikköä, timoteilla 260 yksikköä (Grotelueschen ja Smith 1968). Timotein fruktaanimolekyylien koko on keskimäärin 42 kilodaltonia, kun taas englanninraiheinällä ja nurminadalla keskimääräinen koko on 12-kDa (Pollock ja Cairns 1991). On arvioitu, että noin 15 prosenttia kasveista varastoi ensisijaiseksi varastosokereiksi erilaisia fruktaaneja (Hendry 1993).

Fruktaanien pitkäaikainen varastointi tapahtuu nurmiheinillä ensisijaisesti vegetatiiviseen varastosolukkoon (Pollock 1986). Chatterton ym. (1989) mukaan fruktaanit ovat avustavassa roolissa hiilimetaboliassa, eivätkä ne rajoita fotosynteesiä. Tämän ansioista C3-nurmiheinät pystyvät assimiloimaan sokereiden hiiltä niissäkin tilanteissa, joissa

olosuhteet ovat kasvulle epäsuotuisia. Koska fruktaanipitoisuudelle kasveissa ei ole olemassa suoraa negatiivista säätelyä (Pollock 1986), niiden pitoisuudet voivat varsinkin nurmikasvien versoissa nousta korkeiksi. Solujen vakuoleihin varastoidut sokerit voivat käsittää yli puolet kasvien kuivamassasta- ilman, että yhteyttäminen hidastuu tai estyy (Housley ja Pollock 1985). Massansa puolesta fruktaaneja varastoidaan paljon myös vilja- ja nurmikasvien kukintoihin (Pollock ja Jones 1979) ja nurmiheinien lehdistä fruktaanin pitoisuudet voivat kerryttämisen aikaan olla 20–40 prosenttia kuivamassasta (Cairns ja Pollock 1988b). Fruktaanien osmoottinen potentiaali on pieni, minkä vuoksi niiden varastointi on edullisempaa yksinkertaisempiin sokereihin verrattuna (Pollock 1986). Sakkaroosin ja fruktaanien määrät nurmiheinissä vaihtelevat suuresti kasvien kehitysvaiheesta ja kasvuympäristöstä riippuen (Moriyama ym. 2003; Østrem ym. 2011). Sakkaroosin pitoisuudet ovat yleensä fotosynteesistä aktiivisissa solukoissa suuret (Østrem ym. 2011), mutta karaistumisen aikana vahvasti polymerisoituneiden fruktaanien osuus varastosolukoissa kasvaa. Timotein tyvisipuleissa fruktaanit muodostavat suurimman osan varastosta (Yamamoto ym. 2010).

Lyhytketjuiset fruktaanit ovat nopeasti saatavilla olevia hiilihydraattilähteitä, jotka voidaan nopeasti hajottaa muiksi yksinkertaisiksi sokereiksi ja käyttää siten ravinnoksi kasveille. Pitkäketjuiset fruktaanit käytetään pääasiassa talven yli kestävään varastointiin. Uudelleenkasvu niiton tai laiduntamisen jälkeen on nopeampaa niillä lajeilla ja lajikkeilla, joiden fruktaaniketjut ovat lyhyitä, koska tuolloin varastosokerit ovat nopeammin kasvien hyödynnettävissä (Volaire ja Gandoin 1996). Fruktaanit eivät pysty liikkumaan suoraan solusta soluun, vaan ne täytyy hydrolysoida mobilisaatiota varten. Fruktaanien mobilisaatiota katalysoivat erityisesti fruktaanieksohydrolaasi (FEH) ja levanaasi, jotka hydrolysoivat tehokkaasti fruktaanin β -sidoksia. Levanaasin indusoituminen alkaa nurmiheinillä yleensä 48 tunnin sisällä niitosta (Morvan-Bertrand ym. 2001).

5 Nurmiheinien kylmänkestävyys

5.1 Kylmäkestävyyden fysiologiaa

Lämpötila on yksi kasvien levinneisyyttä eniten rajoittavista tekijöistä ja kylmästressi aiheuttaa globaalisti sadonmenetyksiä siinä missä kuumuus ja kuivuuskin (Beck ym. 2007). Lämpötilan vaihtelut sekä päivänpituuden muuttuminen saavat aikaan kasveissa

vasteen, joiden seurauksena kasveissa tapahtuu metabolisia muutoksia. Nämä muutokset mahdollistavat muun muassa kasvusäätelijät kuten abskissi – ja gibberelliinihappo (Reaney ym. 1989). Erityisesti abskissihappo indusoi monia abioottisissa stresseissä ilmentyviä geenejä, mutta sen toiminta kylmyysstressissä on vielä osin epäselvää. Kylmyysstressin aikana ilmenevät geenit toimivat kolmella eri tapaa: ne koodaavat proteiineja, jotka itsessään suojaavat elävää solumateriaalia, kiihdyttävät sekä hiljentävät muiden geenien toimintaa (geeniekspressio) tai toimivat signaaleina stressivasteessa (Thomashow 1999; Shinozaki ja Yamaguchi-Shinozaki 2006). Vuoteen 2006 mennessä kylmyysstressin seurauksena ilmeneviä geenejä oli kasvimaailmassa löydetty yhteensä 54 kappaletta. Vertailun vuoksi kuivuusstressigeenejä 299 ja korkean suolastressin geenejä 213 kappaletta (Shinozaki ja Yamaguchi-Shinozaki 2006). Monet näistä geeneistä ovat aktiivisia useissa stresseissä siten, että ne ilmenevät esimerkiksi niin kuivuus- kuin kylmästressinkin aikana. Toisin sanoen tietyille stressille altistuminen saattaa suojata muiltakin stressiltä (Shinozaki ja Yamaguchi-Shinozaki 2006). Heinäkasveilla frost resistance 2-lokuksen (*Fr2*) geeniperhe (*CBF*) säätelee eniten kylmänkestävyyttä tuottamalla kylmäregulaatiogeenejä (*COR*), joiden transkriptioon vaikuttaa lämpötilan lisäksi valon PAR-säteilyn määrä (Gray ym. 1997).

Nurmiheinät voidaan luokitella kasvuympäristönsä perusteella kahteen eri ryhmään, lauhkean – ja trooppisen vyöhykkeen heiniin. Lauhkean vyöhykkeen nurmiheinät ovat C3-yhteyttäviä, joiden optimikasvulämpötila vaihtelee 18–24 °C välillä. Trooppiset heinät puolestaan ovat enimmäkseen C4-yhteyttäviä ja optimilämpötila kasvulle vaihtelee 27–35 °C välillä (Stier ja Fei 2008). Alhaiset lämpötilat aiheuttavat erilaisia muutoksia kasveissa solutasolla. Yli +0 °C lämpötilassa vaikuttava kylmyysstressi aiheuttaa muun muassa toimintahäiriöitä solukalvoissa, kasvien kasvu hidastuu ja lehtien foto-oksidaatio kasvaa (O’Kane ym. 1996). Jäätymisvaurioita aiheuttaa +0 °C alhaisempi lämpötila, jonka seurauksena soluihin muodostuu jääkiteitä. Solujen sytoplasmassa muodostuvat jääkiteet aiheuttavat häiriöitä soluelinten ja solukalvon toiminnassa, mistä seuraa solukuolema (Pearce ja McDonald 1977). Solunsisäinen jääkiteen muodostuminen vaatii hyvin nopeita lämpötilamuutoksia sytoplasmassa, yli 3 °C muutosta tunnissa (Palva 1994). Pitkäaikaisen jääpeitteen seurauksena on mahdollista, että jää voi myös spontaanisti uudelleenkristallisoitua pienempään pinta-alaan, mikä aiheuttaa helposti soluvaurioita (Knight ym. 1996). Solujen sisäinen jääkiteen muodostuminen on vaikutuksiltaan peruuttamaton, kun taas solun ulkopuolinen jäänmuodostus ei aina

aiheuta pysyvää vaurioita. Jäätymisen aiheuttama veden potentiaaliero saattaa kuitenkin kuivattaa solun (Nilsen ja Orcutt 1996). Yleensä jo kerran kuivuneet solut ovat kestävämpiä jäänmuodostumista vastaan (Taiz ja Zeiger 2010).

5.2 Kylmänkaraistumisen perusta nurmiheinillä

Erilaisten fysiologisten ja biokemiallisten mekanismien summaa, joka valmistaa kasvit kylmän lämpötilan aiheuttamalle stressille kutsutaan kylmänkaraistumiseksi. Karaistumisvaikutuksen saavat aikaan yhdenaikaiset lämpötilan ja valon määrän sekä intensiteetin muutokset. Karaistumista ei voida saavuttaa ilman valoa (Gray ym. 1997). Karaistumiseen vaikuttaa myös veden saatavuus (Fowler ym. 2001). Vaikka monia lauhkean vyöhykkeen nurmiheiniä luonnehditaan yleisesti kylmänkestäviksi, on eri lajien sekä lajikkeiden välillä suuria eroja, milloin kylmänkaraistuminen tapahtuu ja millaisia minimilämpötiloja kasvit kykenevät sietämään ilman merkittäviä soluvaurioita (Stier ja Fei 2008). Talvehtivat lajit joilla karaistumisprosessi alkaa aikaisin, ovat muovautuneet kestämaan pitkäaikaista kylmyysstressiä. Vastaavasti myöhemmin ja siten heikommin karaistuvat lajit ovat herkempiä kylmyysstressille ja niiden karaistuminen purkautuu keväällä nopeammin (Junttila ja Kaurin 1990). Varsinainen kylmänkaraistuminen tapahtuu nurmikasveilla kahdessa vaiheessa, joista jälkimmäisen avulla saavutetaan varsinainen kylmänkestävyys. Suurimmalle osalle lauhkean vyöhykkeen nurmista kylmänkaraistumisen ensimmäisen vaiheen laukaisee 0–7 celsiusasteen lämpötilat noin 2–3 viikon ajan (Sakai ja Larcher 1987). Tänä aikana kasvit varastoivat orgaanisia yhdisteitä, kuten pitkäketjuisia hiilihydraatteja ja lipidejä. Varastoaineiden kertyminen ja kuljetus valmistavat kasveja karaistumisen toiseen vaiheeseen, jossa varasto- ja membraaniproteiinit syntetisoidaan muotoon, joka mahdollistaa maksimaalisen kylmänkestävyyden (Stier ja Fei 2008).

5.3 Fysiologiset ja biokemialliset muutokset karaistumisessa

Kasvien solukalvot ovat kylmästressin haavoittuvin osa, koska suurin osa solujen metaboliasta (fotosynteesi ja soluhengitys mukaan luettuna) tapahtuu nimenomaan solukalvoilla. Tämän vuoksi karaistumisen päätehtävä on stabilisoida solukalvot matalan lämpötilan aiheuttamaa stressiä vastaan (Thomashow 1999; Stier ja Fei 2004). Karaistumisprosessissa desaturaasiensyömin toiminta kasvaa, mikä lisää

tyydyttymättömien rasvahappojen määrää solukalvoissa. Tämän ansiosta membraanien proteiinit pysyvät juoksevina paremmin ja toimivat siten normaalisti (Ariizumi ym. 2002). Heinäkasveilla matala lämpötila yhdessä valon määrän kanssa rajoittaa fotosynteesin toimintaa, mikä johtuu fotoinhibitiosta, hiilen assimilaatioon liittyvien entsyymien toiminnan heikkenemisestä tai hiilihydraattien kerryttämisestä, joka säätelee osittain entsyymien toimintaa (Powles 1984). Tämän lisäksi Calvinin syklin entsyymit inaktivoituvat ja Rubiscon toiminta estyy. Lyhytaikainen liukoisten sokerien kerryttäminen myös säätelee fotosynteesin proteiinien ilmentymistä ohjaavia geenejä, estämällä muun muassa Rubiscon pienten alayksikköjen toimintaa (Foyer 1990; Goldschmidt ja Huber 1992). Nurmiheinien kylmänkestävyyden ja talvehtimisen kannalta erittäin oleellista on myös liukoisten sokerien ja proteiinien kerryttäminen varastosolukoihin (kuva 4) (Stier ja Fei 2008).



Kuva 4. Kylmästressin vaikutukset kasvien aineenvaihduntaan: jäätymisenestoaineina toimivien orgaanisten yhdisteiden kerryttäminen alkaa ja kylmästressiproteiinien translaatio käynnistyy. Muokattu Stier ja Fei (2008) sekä Griffith ja Yaish (2004) mukaan.

6 Kylmästressin proteiinit

Monivuotisten kasvien proteiinimetabolia kylmänkaraistumisen aikana on hyvin dokumentoitu (Levitt 1980; Guy 1999) ja sen vuoksi liukoisten proteiinien kerryttämistä ja merkitystä karaistumisessa sekä kylmänkestävyydessä on voitu selvittää tarkemmin. Kylmäregulaatio-geenien (*COR*) transkriptio moninkertaistuu alhaisissa lämpötiloissa. Thomashow (1999) mukaan useimmilla kylmyysstressissä koodatuilla proteiineilla ei ole entsyymien kaltaista vaikutusta, vaan proteiinien fysiologinen toiminta perustuu

proteiinien kykyyn muuttaa muotoaan ja toimia jäänestoaaineina. Tämän lisäksi proteiinit toimivat typpivarastoina talvena aikana.

6.1 Lämpöshokkiproteiinit

Alhaisen lämpötilan aiheuttama stressi saa aikaan lämpöshokkiproteiinien (HSP) translaation, jotka ohjaavat proteiinien laskostumista (Thomashow 1999). HS-proteiinien muodostumista ohjaa lämpöshokki-transkriptiotekijä *HSf* (Yang ja Nevo 2016). Kaikki tutkitut organismit reagoivat korkeaan lämpötilaan tuottamalla HS-proteiineja ja niiden biosynteesi on nopeaa (Yost ym. 1990). Kasvimaailmassa 10/11 HS-proteiinien luokista liittyvät joko proteiinimetaboliaan stressittömässä tilassa tai kuumuusstressiin. Kylmästressissä koodattavista HS-proteiineista suurin osa ei kuulu luokituksestaan kaperoniproteiineihin, kuten muut HS-proteiinit. (Thomashow 1999). Tunnetuimpia kylmässä indusoituvia HS-proteiiniluokkia ovat muun muassa Hsps104 ja 90, kaksi jäsentä proteiini Hsp70-perheestä sekä myös kaksi pienempää jäsentä sHSPS-perheestä, jonka proteiinien molekyylikoko vaihtelee 12–42-kDa välillä (Santhanagopalan ym. 2015). Hsp70 on tutkittu muun muassa vehnällä (*Triticum aestivum* L.) ja kyseisen proteiinin määrän huomattiin kasvavan kylmästressille alistetuilla kasveilla (Kosová ym. 2011). Lituruoholla Hsp70 siirtyy kylmyysstressin aikana tumasta sytosoliin suojaamaan tuman proteiineja aggregaatiolta (Bae ym. 2003). Kylmänkestävyyden kannalta sHSP-perhe on merkittävin (Wang ym. 2004) ja monilla talvehtivilla kasveilla kyseiset proteiinit varastoituvat vegetatiivisiin elimiin (Alamillo ym. 1995). Trasngeenisellä tupakalla (*Nicotiana tabacum* L.) on todistettu mahdollinen yhteys liukoisten varastoproteiinien ja pienten lämpöshokkiproteiinien kerryttämisen välillä (Lubaretz ja Niedin 2002). Pienten lämpöshokkiproteiinien tärkeydestä kertoo se, että niitä koodaavia geenejä on tähän mennessä löydetty useita kymmeniä, vehnällä jopa 50 (Waters ym. 2008).

6.2 Dehytriinit

Dehytriinit ovat osa LEA I ja LEA II-proteiineja (*late embryogenesis abundant proteins*), joita kasvien tunnetaan kerryttävän myöhäisen alkiokehityksen aikana. Dehytriinien tuotannon vegetatiivisissa soluissa laukaisee myös kasvien kohtaama fysiologinen stressi, joka aiheuttaa kasvisolun kuivumista (Ingram ja Bartels 1996). Kasvihormoneista

abskissihapon tiedetään edistävän dehytriinien tuotantoa. Dehytriinien molekyylimassa vaihtelee 9–200-kDa välillä ja niiden rakenteesta on tunnistettu viisi erilaista alaryhmää, jotka muodostuvat kolmesta aminohappopitoisesta segmentistä. Close (1997) mukaan dehytriinit luokitellaan proteiineiksi, joissa on ainakin yksi hyvin lysiinipitoinen aminohapposekvenssi, niin kutsuttu K-segmentti. Dehytriinit ovat hydrofiilejä johtuen verrattain suuresta glysiinin määrästä ja ne ovat myös melko stabiileja lämpötilamuutoksille (Bray 1993). Houde ym. (1992) todistivat ensimmäisenä WSC120-proteiiniperheeseen kuuluvien dehytriinien korrelaation kylmänkestävyyteen. Tätä on hyödynnetty muun muassa lajikejalostuksessa. Dehytriinien tehtävät soluissa vaihtelevat paljon, mutta esimerkiksi kylmänkestävyyttä lisääviä dehytriinejä, joiden funktio nykyään jo tunnetaan, on löydetty muun muassa viljakasveilta ja sinimailaselta. Useimmiten dehytriinien kyky torjua pakkasen aiheuttamaa kuivuusstressiä liittyy solujen kuivumisen estämiseen; solunesteen vähenevän vesipitoisuuden on todettu aiheuttavan konformaatioita, joiden seurauksena proteiinien rakenne muuttuu suuntaan, joka estää tehokkaammin veden virtausta solusta, estäen solun kuivumisen. Joidenkin dehytriinien on havaittu toimivan jäätymisenestoaineina muille proteiineille, entsyymeille ja lipideille (Lin ja Thomashow 1992; Wisniewski ym. 1999), mutta Hughes ym. (2013) mukaan dehytriinit eivät itsessään kykene vaikuttamaan solujen jääkiteiden kokoon, toisin kuin tietyt jäätymisenestoproteiinit. Ohralla Dhn5 (75-kDa) on yleisin kylmänkaraistumiseen liittyvä dehytriini (Crosatti ym. 1994) ja sen pitoisuudet korreloivat Kosová ym. (2011) tutkimuksissa talvenkestävyyttä. Volaire (2002) raportoi, että kokoluokkaan 22–24-kDa kuuluvilla dehytriineillä voi olla erittäin suuri merkitys kuivuuden kestävydessä.

6.3 Jäätymisenestoproteiinit

AF-proteiinit (*antifreeze proteins*) ovat nimensä mukaisesti jäätymisenestoproteiineja, joita ohjaavat geenit ovat responsiivisiä patogeeneille (PR-proteiinit), muille vieraille organismeille, jasmonaateille, etyleenille ja salisyylihapolle (Gozzo 2003). Erityisesti etyleenin on havaittu olevan AF-proteiinien tuottoa vahvasti ohjaava hormoni (Yu. ym. 2001). Kasveista eristetyistä AF-proteiineista suurin osa on erilaisia kitinaaseja, endokitinaaseja sekä endoglukanaaseja (Griffith ja Yaish 2004). AF-proteiineja esiintyy vain talvehtivissa kasveissa, jotka kykenevät sietämään jäänmuodostumista soluissaan. AF-proteiinit ovat läsnä varsinkin kasvien talvehtivissa elimissä ja lehdistä. Alhainen

lämpötila yhdessä lyhenevän päivänpituuden kanssa saavat aikaan AF-proteiinien tuotannon ja kerryttämisen eri kasvinosiin (Marentes ym. 1993). Proteiinien toiminta perustuu niiden erittämiseen solujen epidermin apoplastiin ja muihin solunsisäisiin tiloihin, joissa proteiinit sitoutuvat peruuntumattomasti jääkiteiden pintaan ja sulautuvat jääkristallien hilarakenteeseen. Tällä tavoin jääkiteiden kasvua ja uudelleen muodostumista pyritään hidastamaan (Griffith ja Antikainen 1996). Syysruis (*Secale cereale* L.) on ollut AF-proteiinien tutkimuksessa eräs tärkeimmistä mallikasveista ja merkittävimmät rukiin lehdistä löydetty AF-proteiinit ovat 35-kDa, luokan I kitinaasi ja 28-kDa, luokan II kitinaasi. Näiden kitinaasien aktiivisuuteen kasviravinteista kalsiumilla on vahva korrelaatio, toimien siten jäätyksenestoa parantavana ravinteena (Stressmann ym. 2004). AF-proteiinien yksilöllinen tunnistaminen on usein haasteellista ja perustuu proteiinien kontaktiin jään kanssa (Griffith ja Yaish 2004).

7 Vegetatiiviset varastoproteiinit (VSP)

Siemenlevintäisten kasvien päätehtävänä on turvata tulevan sukupolven kehittyminen ja sen vuoksi kasvit tuottavat ja varastoivat paljon erilaisia proteiineja kehittyviin siemeniin, jotka toimivat ravintona itävälle siemenelle. Viljakasveilla jopa puolet kaikista kehittyneen siemenen proteiineista ovat erilaisia varastoproteiineja, joista tärkeimpiä ovat prolamiinit ja globuliinit (Shewry ja Halford 2002). Siementen varastoproteiineja tutkittaessa havainnoitiin, että myös ei-generatiiviset solukot tuottavat proteiineja, jotka ovat erilaisia siementen varastoproteiineihin verrattuna, mutta karaktääriltään hyvin samanlaisia. Näitä proteiineja kutsutaan vegetatiivisiksi varastoproteiineiksi (Staswick 1990). VS-proteiineille on olemassa ominaisuuksia, jotka erottavat ne muista kasvien proteiineista: vegetatiivisten varastoproteiinien synteesi ilmenee eniten kasvin varastoelinten muodostuessa. Lisäksi VSP:t tyhjenevät varastoelimistä kasvusolukkojen uudelleen aktivoituessa ja niiden pitoisuudet ovat huomattavasti suurempia muihin proteiineihin verrattuna kasvien talvehtivissä elimissä, jopa 40 prosenttia liukoisten proteiinin kokonaismäärästä (Cyr ja Bewley 1990). Nämä varastoproteiinit kertyvät yleensä monivuotisten kasvien talvehtiviin elimiin erityisesti syksyn sekä alkutalven aikana ja hydrolysoituvat taas keväällä, kun verson kasvu alkaa uudelleen (Bouchart ym. 1998). VS-proteiinit varastoituvat pääosin solujen vakuoleihin (Staswick 1990; Stephenson ym. 1998).

Syyt kausittaiseen proteiinivarastointiin ovat osin epäselvät ja aikaisemmat tutkimukset poppelin (Lawrence ym. 1997) sekä soijapavun (Staswick 1988) osalta viittasivat siihen, että ulkoiset ympäristötekijät kuten päivänpituus, valon intensiteetti ja lämpötila vaikuttavat typen nielu/lähde suhteeseen ja vaikuttavat siten typen kerryttämiseen varasto-osiin. Siihen oletettavasti vaikuttavat tietyt endogeeniset molekyylisignaalit kuten liukoiset sokerit ja jasmiinihappo (Meuriot ym. 2003). Typpilannoituksen lisäyksellä ei aina ole saatu vastetta VS-proteiinien akkumulaatioon; esimerkiksi sikurilla typen lisäys ei aiheuttanut merkittävää muutosta proteiinien määrässä, vaan varastointi tapahtui kasvun kustannuksella (Améziane ym. 1997).

Lauhkeilla nurmiheinillä liukoisten sokerien kerryttäminen on mielletty eniten talvenkestävyyttä ja kevätkasvua parantavaksi tekijäksi (MacAdam ja Nelson 2003), mutta nykytietämyksen mukaan myös vegetatiiviset varastoproteiinit saattavat olla heinäkasveille tärkeitä erityisesti kevätkasvun alkaessa. Ne toimivat typpireservinä, kun kasvi itse ei pysty ottamaan tarpeeksi typpeä maasta tai sitä on niukasti saatavilla. Kasvien epäorgaanisen typen saanti on erityisen heikkoa varhain keväällä sekä välittömästi niittojen jälkeen. Esimerkiksi sinimailasella kuiva-aineen tuotto niiton jälkeen oli enemmän riippuvainen liukoisten proteiinien pitoisuudesta kuin kokonaistyyppipitoisuudesta (Avice ym. 1997). Sekä valkoapilalla (*Trifolium repens* L.), että sinimailasella (*Medicago sativa* L.) niitot pudottavat kasvien liukoisten proteiinien pitoisuutta varasto-osissa yli 40 % ensimmäisen kymmenen päivän jälkeen niitosta. Vastaavasti VS-proteiinien hydrolysointi on 60–80 prosentin luokkaa, kun varastotyyppiä mobilisoidaan version uudelleenkasvuun (Hendershot ja Volenec 1993; Avice ym. 1996; Corre ym. 1996; Gana ym. 1998). VS-proteiinit hydrolysoidaan soluissa pääosin glutamiiniksi (Delrot ym. 2001). Cunningham ja Volenec (1998) tutkivat VS-proteiinien kausittaista kertymistä sinimailasan pääjuureen ja havainnoivat VSP-pitoisuuden nousevan jopa nelinkertaiseksi syksyllä. Tämän tyyppistä syysakkumulaatiota on havaittu monilla monivuotisilla kasveilla kuten nokkosella (*Urtica dioica* L.) ja voikukalla (*Taraxacum officinale* L.). Volenec ym. (1996) todistivat VSP-kerryttämisen korreloivan parempana kylmänkestävyytenä sinimailasella. Monet kylmänkestävyyttä nostavista varastoproteiineista toimivat myös patogeenienkestävyyttä parantavina proteiineina, joiden rakenteet muistuttavat luokan III kitinaaseja ja AF-proteiineja (Avice ym. 2003; Meuriot ym. 2004). Sinimailasan pääjuureen kertyviä VS-proteiineja tunnetaan melko hyvin ja niistä tärkeimmät ovat proteiinit 15,19- ja 32-kDa. Nämä proteiinit varastoidaan

puusolukon parenkyymisolujen vakuoleihin (Avice ym. 1996). Valkoapilalla tärkein ja tunnetuin VS-proteiini on 17.3-kDa, joka on samankaltainen kuin abskissihapolle ja patogeeneille (PR-10) vasteelliset proteiinit. Muista tutkituista VS-proteiineista poiketen 17.3-kDa varastoituu valkoapilan rönsyjen kuoren parenkyymisolujen sytosoleihin, ei vakuoleihin. Kyseinen proteiini todennäköisesti toimii kuten AF-proteiinit ja sen pitoisuus kasvaa kylmänkaraistumisen aikana (Goulas ym. 2007) Nurmiheinistä englanninraiheinällä (Louahia ym. 1999), rehukattaralla (Gloser 2005) ja sormiheinällä (*Cynodon dactylon* L.) (Gatschet ym. 1994) on tutkittu liukoisia proteiineja ja potentiaalisia polypeptidiketjuja, jotka voisivat täyttää VS-proteiinien määritykset.

8 Liukoiset sokerit ja kylmästressi

8.1 Liukoiset sokerit ja kylmänkaraistuminen

Pollock ja Ruggles (1976) havaitsivat fruktaanisynteesin tehostuvan nurmilla kasvulämpötilan pudotessa lähelle +5 °C. Fruktaanisynteesin normaali toiminta matalissa lämpötiloissa luo edellytyksen parantaa kylmänkestävyyttä (Suzuki 1989). Fruktaanien kerryttäminen syysviljoilla ja talvehtivilla nurmilla kiihtyy kylmänkaraistumiseen aikaan, johon liittyy vahvasti kasvulämpötilan lasku sekä yö- ja päivälämpötilan kasvava ero. (Thorsteinsson ym. 2002). Verson kasvun hidastuessa/loppuessa yhteyttämistuotteita kuluu vähemmän kasvun ylläpitoon, jolloin sakkaroosin pitoisuus soluissa nousee. Tämä taas lisää sakkaroosin kuljetusta varastosolukkoihin ja nostaa fruktaanisynteesin määrää (Pollock ja Cairns 1991). Karaistumisen toisessa vaiheessa ($t < 0$ °C) pitkäketjuisten fruktaanipolymeerien pitoisuus pienenee, kun taas lyhytketjuisten polymeerien ja oligosakkaridien konsentraatio kasvaa. Kasvit siis hajottavat fruktaania ja kykenevät siten muuttamaan osmoottista painetta soluissa ja parantamaan sen hetkistä kylmän kestävyttä (Suzuki 1989). Erityisesti sakkaroosi toimii jäänestoaineena madaltaen solun vesipotentiaalia, estäen solun kuivumisen pakkasella (Dionne ym. 2001).

8.2 Fruktaanit talvehtimisessä ja kevätkasvussa

Kasvien kyky varastoida pitkäketjuisia sokereita talvehtiviin elimiin on ehtona monivuotisten kasvien talvenkestävyydelle ja kevätkasvulle. Kasvit soluhengittävät aktiivisesti talven aikana, minkä vuoksi pitkäketjuisten varastosokerien hajottaminen talvella ja keväällä tuottaa energiaa soluhengitykseen ja mahdollistaa nopean

kevätkasvun. Lyhytketjuiset fruktaanit ovat kasvien nopeasti saatavilla olevia hiilihydraattilähteitä, jotka voidaan hajottaa sakkaroosiksi (Volaire ja Gandoin 1996). Sakkaroosi puolestaan hydrolysoidaan invertaasi-ensyymien avulla glukoosiksi ja fruktoosiksi, jotka ovat käyttökelpoista energiaa kasveille (Tronsmo ym. 1993).

Syksyllä ja alkutalvesta sokereiden kertyminen nostaa solunesteen väkevyyttä ja vähentää siten haitallisten jääketeiden muodostumista. Lisäksi sokerien metabolia synnyttää hieman lämpöä, joka myös hidastaa jäätymistä (Pollock ja Jones 1979). Suzuki (1989) mukaan varastofruktaanien hajottaminen osmoottisen paineen säätelyssä on mahdollisesti merkittävin nurmiheinien kylmänkestävyyttä parantava tekijä, suojaten solujen vakuoleja plasmolyysiltä. Kylmänkestävyyden lisäksi korkea fruktaanipitoisuus vaikuttaa myös positiivisesti kevätkasvuun (White 1973). Halling (1988) havaitsi viimeisen niiton ajankohdan vaikuttavan timotein fruktaanikonsentraatioon nuorissa versoissa syksyllä sekä sitä seuraavana keväänä. Samaisessa tutkimuksessa korkeampi fruktaanipitoisuus syksyllä korreloi suurempaa liukoisten sokerien määrää keväällä ja siten parempaa kevätkasvua.

8 Tutkielman tavoitteet

Tutkielman taustalla oli Luonnonvarakeskuksen, Yara Suomi Oy:n ja Helsingin yliopiston yhteinen tutkimushanke koskien typpilannoituksen satovasteita modernissa nurmiviljelyssä. Uuden tutkimustiedon valossa havaittiin, että nykyisten timoteilajikkeiden satovaste niille annettua typpikiloa kohti on huomattavasti korkeampi kuin aikaisemmissa suomalaisissa tutkimuksissa vuosina 1964–2003 (Salo ym. 2013). Satovasteiden ja typpitaseiden perusteella nurmien typpilannoitusta voitaisiin nostaa nykyisestä. Tällä hetkellä ympäristökorvauksen mukainen typpilannoituksen enimmäismäärä on säilörehunurmille 160–240 kg/ha vuodessa, riippuen peltomaan multavuudesta ja sadonkorjuukertojen määrästä. Nitraattiasetuksen (VN 2014) enimmäismäärä typpilannoitukselle puolestaan on 250 kg/ha vuodessa.

Tämän tutkielman tavoitteena oli selvittää, miten lajike ja typpilannoitustaso vaikuttavat timotein tyvien liukoisten sokerien- ja proteiinien määrään syksyllä ja sitä seuraavana keväänä. Tarkoituksena oli myös selvittää miten nämä kaksi muuttujaa vaikuttavat talvituhojen määrään ja sitä kautta kevätkasvuun. Syksyn tyvinäytteiden keruu ajoitettiin siten, että timotein versojen pituuskasvu oli loppunut ja kylmänkaraistuminen oli alkanut.

Keväällä näytteenotto suoritettiin ennen kevätkasvun alkamista, jolloin liukoisia sokereita on kulutettu vain talvehtimiseen ja typpivarastot ovat edelleen mobilisoimatta kasvua varten.

Tutkimuksen hypoteesit olivat liukoisten sokerien osalta seuraavat:

H_0 : ”Typpilannoitus tai lajike eivät vaikuta timotein tyvien liukoisten sokerin määrään syksyllä ja keväällä”

H_1 : ”Typpilannoitus tai lajike vaikuttavat timotein tyvien liukoisten sokerien määrään syksyllä ja keväällä”

Liukoisten proteiinien osalta hypoteesit olivat:

H_0 : ”Typpilannoitus tai lajike eivät vaikuta liukoisten proteiinien määrään syksyllä ja keväällä”

H_1 : ”Typpilannoitus tai lajike vaikuttavat liukoisten proteiinien määrään syksyllä ja keväällä”

9 Aineisto ja menetelmät

9.1 Peltokokeen koejärjestely

Typpiporraskokeen koepaikkoina olivat Luonnonvarakeskuksen Maanigan (Itä-Suomi, 63°08' N) ja Ruukin (Pohjois-Pohjanmaa, 64°41' N) tutkimusasemat. Heinäkuussa 2014 molemmille asemille perustettiin epätäydellisten lohkojen osaruutukoe (*incomplete split-plot*) koejärjestelyllä nurmikoeruudut. Koeasetelman pääruutuja olivat timoteilajikkeet Nuutti (tähkälle tulo 47 vrk) ja Grindstad (tähkälle tulo 45 vrk) sekä nurminata Valtteri (tähkälle tulo 45 vrk). Typpilannoitus oli kokeessa osaruutuna. Typpiportaita oli kokeessa kahdeksan- (0 kg N/ha – 450 kg N/ha) ja jokaisesta koejäsenestä oli yhteensä 4 kerrannetta ja koeruutuja oli yhteensä 96 (liitteet 1 ja 2). Kahdeksan typpiporrasta sisältävät pääruudut jaettiin kahteen neljän portaan lohkoon. Lohkot arvottiin kullekin kerranteelle satunnaiseen järjestykseen. Reunavaikutusta estämään perustettiin suojaruudut jokaisen kerranteen päihin, sekä jokaisen neljän koejäsenen muodostaman lohkon väliin. (liitteet 1 ja 2). Molemmista koepaikoista otettiin maanäyteanalyysit kesäkuussa 2014 ennen ruutujen perustamista (liite 3).

Koeruutujen koko oli $1,50 \times 8 \text{ m} = 12 \text{ m}^2$. Kylvösiemenmäärä oli virallisten lajikekokeiden mukainen: timotei 3000 kpl itävää siementä/m². Suojakasviksi valittiin ohra, rikkakasvitorjunta herbisideillä torjuntavuonna sekä tarvittaessa nurmivuosina. Koeruudulta korjattiin nurmisato kolme kertaa kasvukauden aikana vuosina 2015–2017. Ruutujen lannoitus nurmivuosina tehtiin kolmessa osassa (taulukko 2), 1. lannoitus keväällä, heti kasvukauden alkaessa ja toinen sekä kolmas lannoitus heti korjuukertojen jälkeen (taulukko 1). Fosforin ja kaliumin lannoitusmäärät eivät rajoittaneet nurmien kasvua. Toteutuneet lannoitus suunnitelmat kasvukaudelle 2016 löytyvät liitteistä 4 ja 5. Pro Gradu-työhön valittiin Maaningalta timoteilajikkeiden Nuutti ja Grindstad kaikki kerranteet, typpitasot 150, 250, 350 ja 450 kg N/ha. Kerranteesta yksi jätettiin pois koejäsen Nuutti 150 kg N/ha ja kerranteesta kaksi Nuutti ja Grindstad 150 kg N/ha. Koejäsenet hylättiin vuoden 2016 lannoitusvirheiden vuoksi. Maaningalta oli siten yhteensä 29 eri koeruutua. Ruukin koeasemalta valittiin lajikkeeksi Grindstad ja kerranteet 2, 3 ja 4. Typpitasot olivat 150- ja 350 kg N/ha. Koeruutujen kokonaismäärä oli tuolloin kuusi.

Taulukko 1. Koeasemien Maaninka ja Ruukki viljelytoimenpiteet timoteilajikkeiden osalta vuosina 2015 ja 2016.

	Maaninka 2015	Maaninka 2016	Ruukki 2015	Ruukki 2016
Rikkakasvitorjunta	3.7.	19.5.	-	8.7.
Lannoitus 1. Sadolle	21.–22.5.	10.5.	25.–26.5	10.–11.5.
1. niitto (Grindstad)	17.6.	7.6.	17.6.	14.6.
Lannoitus 2. sadolle (Grindstad)	18.6.	7.6.	18.6.	14.6.
1. niitto (Nuutti)	22.6.	13.6.	24.6.	20.6.
Lannoitus 2. sadolle (Nuutti)	22.6.	13.6.	24.6.	22.6.
2. niitto (Grindstad)	22.7.	13.7.	21.7.	19.7.
Lannoitus 3. sadolle (Grindstad)	22.7.	13.7.	22.7.	20.7.
2. niitto (Nuutti)	28.7.	19.7.	27.7.	26.7.
Lannoitus 3. sadolle (Nuutti)	28.7.	19.7.	28.7.	27.7.
3. niitto (Grindstad)	3.9.	25.8.	3.9.	31.8.
3. niitto (Nuutti)	9.9.	31.8.	3.9.	8.9.

Taulukko 2. Lannoitusportaat ja lannoitetyypen jako eri sadoille

Typen jako:		0.44	0.36	0.20
N-lannoitusportaat (kg N ha ⁻¹)		1. sato	2. sato	3. sato
2.	150	66	54	30
4.	250	110	90	50
6.	350	154	126	70
8.	450	198	162	90

9.3 Versotiheysmittaukset

Pro Gradu-työn koejärjestelyt alkoivat 17.10.2016 Maaningalla, jolloin laskettiin koeruutujen versotiheydet. Jokaisesta ruudusta valittiin satunnaisesti (ei aukkoja) viisi 20 cm pituista, yhden kylvörivin levyistä aluetta, joiden yksittäisten versojen määrät laskettiin yhteen ja johdettiin kunkin ruudun versotiheys/m². Ruukissa versotiheydet mitattiin samalla periaatteella 24.10.2016. Keväällä versotiheyksiä ei laskettu.

9.4 Tyvinäytteiden otto ja käsittely

18.10.2016 alkoi tyvinäytteiden otto, jossa aluksi ensimmäisestä ruudusta otettiin kaksi kappaletta noin 20 cm pitkät maapaakut, 70 cm kylvörivin päästä. Muista koeruuduista näytemäärä vakiinnutettiin kolmeen 5 tai 10 cm pitkiin paakkuihin, jotka myös otettiin 70 cm kylvörivin päästä. Jokainen näyte oli yhden kylvörivin (15 cm) levyinen. Näytteet kerättiin lapiota ja leikkuuveitsiä käyttäen, siten, että mahdollisimman vähän maa-aineista tulee mukaan, ja että versot säilyvät ehjänä (kuva 5). Näytteet merkittiin muovipusseihin ja siirrettiin kylmiöön (+5 °C) odottamaan jatkokäsittelyä. Näytteitä kerättiin sen mukaan, miten työ eteni jatkoprosessoinnissa. Näytteenotto aloitettiin kerranteesta yksi ja lopetettiin kerranteeseen neljä, pyrkien käsittelemään yksi kerranne päivässä. Keväällä näytteenotto aloitettiin Maaningalla 2.5.2017 koeruutujen ja maaperän ollessa vielä osin jäässä. Näytteiden otto ja käsittely noudattivat samaa kaavaa kuin syksyllä.



Kuva 5. Keväällä 2017 Maaningan koeruuduilta kaivettu näytepaakku.

Jatkokäsittelyssä jokaisen koeruudun kahdesta näytepaakusta mitattiin syksyllä sekä keskimääräinen versojen pituus sekä maksimipituus, joka mitattiin verson tyvestä ylimmän kasvulehden kärkeen. Keväällä pituusmittauksia ei tehty. Mittausten jälkeen näytepaakut rikottiin varovaisesti käsin kylmää vettä käyttäen siten, että pystyttiin erottelemaan yksittäiset versot. Kaikki elävät versot (versot/sivuvorsot, joissa vihreää) eroteltiin omaksi ryhmäkseen, samoin kasvimateriaali, jossa oli kuolleita versoja ja- joista erottui selkeä tyvisipuli. Kuolleita versoja myös lajiteltiin sen mukaan, oliko tyvisipuleissa yhtään lehtivihreää jäljellä. Näissä tyvisipuleissa selkeää sivusilmua ei ollut havaittavissa. Tuloksissa kuolleet tyvet on eritelty kokonaan omaksi ryhmäkseen, riippumatta siitä oliko tyvissä enää lehtivihreää. Elävien ja kuolleiden versojen lukumäärät laskettiin, jonka jälkeen ryhmät valokuvattiin. Kuolleiden tyvien lukumäärä neliömetrille (kpl/m^2) laskettiin näytepaakkujen pinta-alan perusteella.

Kuvaamisen jälkeen elävien versojen tyvistä (juurenniskan ja verson yhteyshaudasta ylöspäin) leikattiin noin 3 cm pituinen pätkä (kuva 6), joka puhdistettiin mahdollisimman hyvin juurista ja maa-aineksesta. Tyvien kokonaismäärä laskettiin, ne valokuvattiin ja punnittiin. Punnitusvaiheessa pystyttiin laskemaan, onko näytemateriaalia tarpeeksi analyysihin, minkä perusteella näytettä voitiin ottaa lisää. Punnituksen jälkeen tyvet laskettiin nestetyppeen, jossa niitä pidettiin noin 10 sekuntia, minkä jälkeen tyvet siirrettiin 50 millilitran Sarstedt-koeputkiin. Koeputket puolestaan varastoitettiin 35 litran

nestetyypisäiliöön. Leikattu kasvimateriaali (versot/lehdet) punnittiin ja siirrettiin kuivatusuuniin kuivattavaksi (+60 °C, 40–48 tuntia). Ruukista tulleet näytteet kuljetettiin Maaningalle pakattuna kylmälaukkuihin. Ruukin näytteet käsiteltiin samalla tapaa kuin Maaningan näytteet. Maaningalta jatkoanalyysiin meneviä näytteitä oli syksyllä 31 ja keväällä 29 (syksyllä kaksi ylimääräistä näytettä). Ruukin näytteitä oli syksyllä ja keväällä kuusi. Versojen kuivamassa neliömetrillä (g/m^2) laskettiin näytepaakkujen versomäärän ja keskimääräisen kuivapainon perusteella. Tyvien lukumäärä (kpl/m^2) ja kuivamassa neliömetrillä (g/m^2) laskettiin samalla tapaa.



Kuva 6. Eroteltuja ja puhdistettuja timotein tyviä.

9.5 Tyvinäytteiden jatkokäsittely

Näytteet siirrettiin koeputkissa nestetypestä kylmälaukkuihin, jotka vuorattiin kuivajäällä. Heti kun näytteet olivat saapuneet Helsingin yliopistolle, ne siirrettiin kylmäkuivuriin (Christ Gamma 2-16 LSC, Iso-Britannia), jonka tyhjiöpaine oli 0,630 millibaaria ja kotelon lämpötila +15 °C. Syksyn näytteitä kuivattiin noin viikon ajan (168 h) ja kevään näytteitä 4 päivää (96 h). Syksyn näytteet olivat tuoremassaltaan selvästi suurempia kuin kevään, minkä vuoksi kuivausaika pidettiin pitkänä. Kuivatut näytteet punnittiin yläkuppivaa'alla ja tulokset kirjattiin ylös. Tämän jälkeen näytteet jauhettiin kuulamyllyllä (Retsch MM 400, Saksa) 50 ml:n adaptereja käyttäen. Näyte jaettiin koosta riippuen kahteen-kolmeen osaan jauhatuksessa. Jauhatusaika oli syksyn näytteissä minuutti ja frekvenssi 30 1/s. Kevätnäytteissä 45 sekuntia ja 30 1/s. Valmiit näytteet siirrettiin uusiin 50 ml:n Sarstedt-koeputkiin odottamaan analyysyä.

9.6 Vesiliukoisten sokerien määrittäminen Nelson-Somogyi-menetelmällä

Jauhetuista syys- ja kevätinäytteistä määritettiin liukoisten sokerien pitoisuus Nelson-Somogyi-menetelmää mukaillen (Somogyi 1945) Luken laboratoriossa Jokioisissa. Määrittäminen perustuu rikkihappoa ja Nelson-reagenssia sisältävän liuoksen reaktioon sokerimolekyylien kanssa. Reaktio aiheuttaa värimuutoksen, joka voidaan määrittää kolorimetrisesti. Määrittämistä varten kuivatut näytteet laimennettiin 1:15. Spektrofotometrinen mittaus (Schimadzu UV-1800, Schimadzu Co., Kyoto, Japani) tehtiin glukoosistandardia vasten. Tulokset olivat muotoa mg/g ka. Sokerimäärä tyveä kohti (mg/tyvi) laskettiin tyvien keskimääräisen kuivapainon perusteella. Neliömetrille sokerien määrä (g/m^2) johdettiin tyvien lukumäärällä näytepaakuissa.

9.7 Typpi- ja proteiininanalyysit

9.7.1 Kokonaistypen analysointi

Jauhettujen tyvinäytteiden typen ja hiilen määrä kuiva-aineessa (%-ka) määritettiin Dumasin polttomenetelmällä käyttäen CHN Elementar vario MAX CN-typianalysaattoria (Elementar Analysensysteme GmbH, Saksa). Analyysit suoritettiin Kielin yliopistossa syys- ja kevätinäytteistä. Tulokset olivat muotoa N-% ja C-%. Tyvien kokonaistypen määrä kuiva-aineessa (mg/tyvi) johdettiin tyvien keskimääräisen kuivapainon perusteella. Typen määrä neliömetrille (g/m^2) johdettiin näytepaakkujen tyvien lukumäärän ja pinta-alan perusteella.

9.7.2 Liukoisten proteiinien analysointi

Syys- ja kevätinäytteiden liukoisten proteiinien määrittäminen Kielin yliopistossa noudatteli Damerval ym. (1986) ohjetta, jota oli muokattu Zöhr ym. (2004) mukaan. Nestetyypessä jauhettuja proteiinipellettejä pestiin hajotusreagensseja I- (1,6 ml asetoni, 160 mg TCA + 80 μl 1 M DTT) ja II (1,5 ml asetoni + 75 μl 1 M DTT) käyttäen. Tämän jälkeen näytteisiin lisättiin erityyspuskuri (8 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS, 30 mM DTT, 20 mM TRIS ja 0,5 % IPG-puskuri) ja proteinaasi-inhibiittoria (2 mM EDTA, SIGMA), joiden avulla hajotettiin mahdolliset ei-liukoiset membraaniproteiinit. Lisäysten jälkeen näytteet laitettiin sekoittajaan kahdeksi tunniksi (+33 °C), vortexilla välillä sekoittaen.

Sekoituksen jälkeen kasvimassa erotettiin sentrifugoimalla näytteitä 30 minuuttia (13000 rpm, +4 °C), jonka jälkeen liukoisia proteiineja sisältävä supernatantti pipetoitiin talteen. Näytteet varastoitettiin -20 °C jatkoanalysointia varten.

Liukoisten proteiinien konsentraation määrittämiseen käytettiin OnePlus 2D Quant kit-reagenssipakkausta (Ge Healthcare Life Sciences, 80-6483-56, Iso-Britannia), jonka määrittysalue on 0-50 µg. Määrittämisessä proteiinit saostettiin ja uudelleen suspensoitiin kuparia sisältävässä liuoksessa. Sitoutumattoman kuparin aiheuttamat värimuutokset luettiin tämän jälkeen spektrofotometrisesti, aallonpituudella 480 nm. Värin intensiteetti on kääntäen verrannollinen proteiinkonsentraatioon tutkitussa näytteessä. Kalibraatiosuoran tekemiseen käytettiin BSA-standardia (naudan boviiniseerumialbumiini) ja tulokset olivat muotoa µg/µl. Uuttotilavuus oli yksi millilitra. Varsinainen liukoisten proteiinien pitoisuus (mg/g) laskettiin kaavalla:

$$\frac{\text{proteiinipitoisuus (mg/ml)} \times \text{uuttotilavuus (ml)}}{\text{kasvinäytteen punnittu massa (g)}}$$

Liukoisten proteiinien määrä timotein tyvissä (mg/tyvi) johdettiin tyvien keskimääräisen kuivapainon perusteella. Liukoisten proteiinien määrä neliömetrille (g/m²) johdettiin näytepaakkujen tyvien lukumäärän ja pinta-alan perusteella.

SDS-PAGE geielektroforeesia varten 2D Quant kit-menetelmällä erotettuja proteiineja keitettiin viisi minuuttia (+ 95 °C) tuplakonsentroidun näytekupin kanssa (10 % glyseroli, 2,3 % SDS, 5 % β-merkaptotetanol, 63 mM Tris-emäs ja 0,05 % bromofenoli), jonka jälkeen näytteet siirrettiin jäihin. Käsittelyn ansiosta proteiinien rakenne denaturoitui ja niille muodostui negatiivinen varaus. Bromofenolinsininen toimi väriaineena, jolla ajoa voitiin seurata. Proteiinit eroteltiin käyttäen 6,3 % peitegeeliä (0,5 M TRIS, 0,4 % SDS pH 6,8) ja 15 % erottelugeeliä (1,5 M Tris, 0,4 % SDS pH 8,8). Näytteet pipetoitiin geeleille ja ajettiin ajopuskurissa (0,25 M Tris, 1,92 Glysiini, 1 % SDS) 70 voltin jännitteellä (Bio-Rad Mini-Protean tetra cell, USA). Polypeptidiketjujen massan arviointiin käytettiin PageRuler- molekyylipainomarkkereita (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Yhdysvallat). Geeliajojen eri proteiinifraktiot ja niiden intensiteetti (polypeptidiraitojen koko) analysoitiin tietokoneohjelmiston avulla. Geeilta pystyttiin erottamaan 16 massaltaan eri kokoista polypeptidiketjua: 119, 90, 75, 55, 41, 30, 26, 24, 23, 22, 21, 19, 16, 15, 14 ja 11-kDa. Näistä ketjuista 75, 41, 19 ja 14-kDa olivat intensiteetiltään suurimmat, muodostaen jokainen noin 10-20 prosenttia

kokonaisintensiteetistä. Tämän vuoksi mahdollisten vegetatiivisten varastoproteiinien tarkastelu keskittyi näihin neljään polypeptidiketjuun. Tämän lisäksi tutkittiin polypeptidiketjujen 21–26-kDa yhteisintensiteetin osuutta, perustuen Gatschet ym. (1994) artikkeliin. Proteiinifraktioiden tulokset ilmoitettiin %-osuutena kokonaisintensiteetistä.

9.8 Tilastolliset analyysit ja menetelmät

Jokaisen selitettävän muuttujan tuloksista laskettiin keskiarvo ja keskiarvon keskivirhe (*Standard error of the mean*, SEM). Tutkielman aineiston varianssianalyysit perustuivat lineaariseen sekamalliin (LSM), joka voidaan esittää suppeasti muodossa:

$$y = X\beta + Zu + \varepsilon$$

missä:

y = tunnetut havainnot

$X\beta$ = kiinteiden vaikutusten termi

$Zu + \varepsilon$ = satunnaistermit

Maaningan aineistoon sovitetussa mallissa kiinteinä vaikutuksina olivat lajike, tyypitaso ja lajike x tyypitaso -yhdysvaikutus. Ruukissa kiinteänä vaikutuksena oli tyypitaso.

Satunnaistermeinä Maaningalla oli kerranne sekä kerranne x lohko yhdysvaikutus, Ruukissa vain kerranne.

Varianssien yhtäsuuruuden tarkastelu tehtiin yksisuuntaisen varianssianalyysin Levenen testiä käyttäen. Jos selitettävän muuttujan testi oli positiivinen ($p < 0,05$), niin varianssit eri ryhmien välillä tulkittiin eri suuriksi ja muuttujille tehtiin logaritimuunnos luonnollista logaritmia käyttäen. Sekamallien tulokset laskettiin SAS-ohjelmiston MIXED-proseduuria käyttäen (SAS Enterprise Guide 7.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Pää- ja yhdysvaikutustermit olivat tilastollisesti merkitseviä p-arvon ollessa $< 0,05$ ja erittäin merkitseviä, kun $p < 0,001$. Maaningan mallissa tyypitason päävaikutusta ja lajike x tyypitaso yhdysvaikutusta parivertailtiin Tukeyn testin avulla. Tulokset olivat tilastollisesti merkitseviä, kun p-arvo oli $< 0,05$.

Lineaariset regressioanalyysit suoritettiin IBM SPSS Statistics 23-ohjelmistolla (Armonk, NY, USA). Tutkittavien muuttujien vaihtelua selitettiin F-testin avulla (p-arvo) ja suoraviivaisen korrelaation vahvuutta kuvattiin Pearsonin korrelaatiokertoimella (r). Tulosten hajontaa on esitelty regressiosuoran avulla, jossa selitysvoimaa on kuvattu R^2 -luvun avulla. Regressiosuora noudattaa kaavaa:

$$Y = a + bX,$$

missä:

Y = selitettävän muuttujan arvo

a = vakio

X = selittävän muuttujan arvo

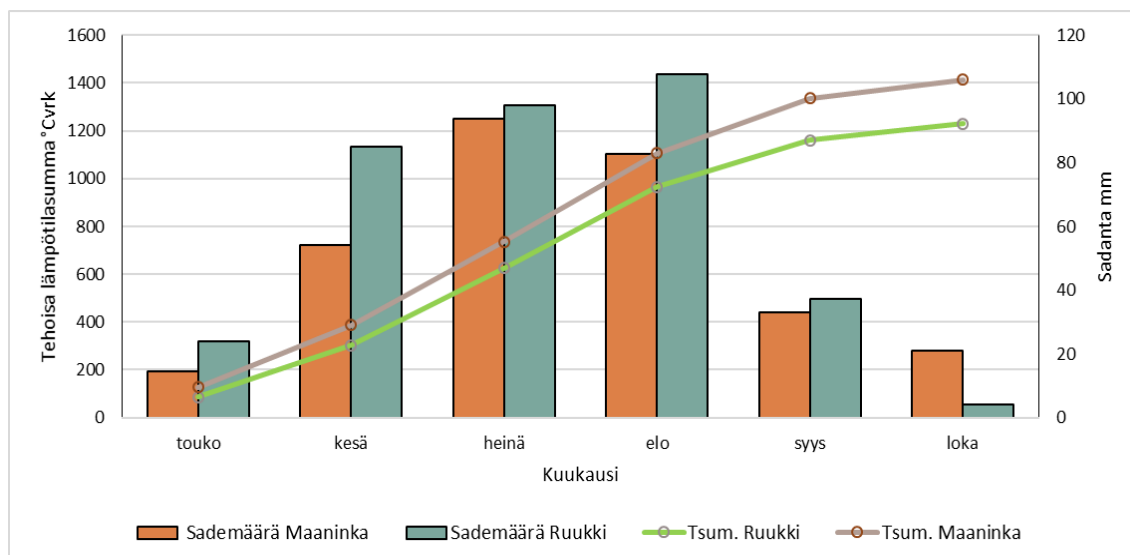
b = regressiokerroin

Kuvissa esitetyt keskiarvot on laskettu lajike- ja tyyppitasokohtaisesti, kuten myös keskiarvojen keskivirhe (SEM).

10 Tulokset

10.1 Koevuosien 2016-2017 sääolot

Kesä 2016 oli yleisesti erittäin hyvä nurmien kasvulle, johtuen verrattain lämpimästä keväästä ja riittävästä sademäärästä. Terminen kasvukausi alkoi Maaningalla vuonna 2016 26.4 ja Siikajoen Revonlahdella (Ruukki) 27.4. Pitkän aikavälin vertailussa vuosilta 1981–2010 ajankohta on molemmille mittauspaikoille lähes normaali (Ilmatieteenlaitos 2017a). Kasvukauden tehoisa lämpösumma ja sademäärä olivat Maaningalla 1415 astevuorokautta ja 279 millimetriä ennen näytteenoton aloittamista 18.10.2016 (kuva 7). Nuutilla kolmannelta niitosta oli tuolloin aikaa 42 vuorokautta, Grindstadilla 48 vuorokautta. Lämpösummaa kertyi Nuutilla 172 ja Grindstadilla 214 astevuorokautta. Sademäärät olivat vastaavasti 25 ja 41 millimetriä. Ruukissa tehoisa lämpösumma ja sademäärä olivat ennen näytteenottoa 21.10.2016 1231 astevuorokautta ja 353 millimetriä (kuva 7). Grindstad-näytteiden niitosta oli tuolloin aikaa 45 vuorokautta. Tuona aikana lämpösummaa kertyi 150 astevuorokautta ja sademäärä oli 38 millimetriä.

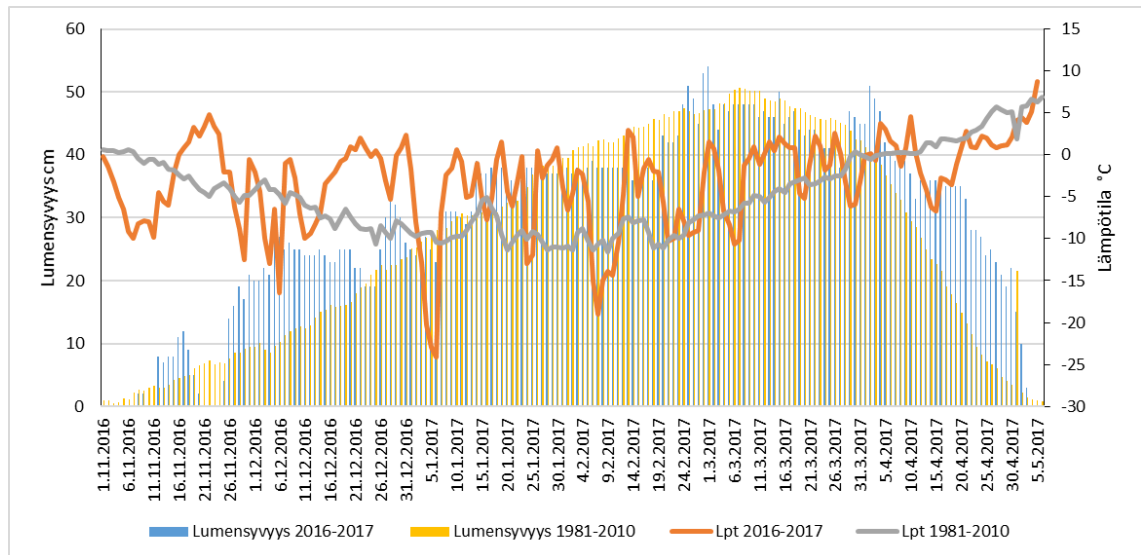


Kuva 7. Tehoisan lämpösumman kertyminen ja sadanta Maaningan ja Revonlahden (Ruukin) mittauspisteissä kasvukaudella 2016. Pystypalkit ilmaisevat kuukauden sademäärän ja viivat kasvukauden tehoisan lämpösumman kertymisen eri koepaikoilla.

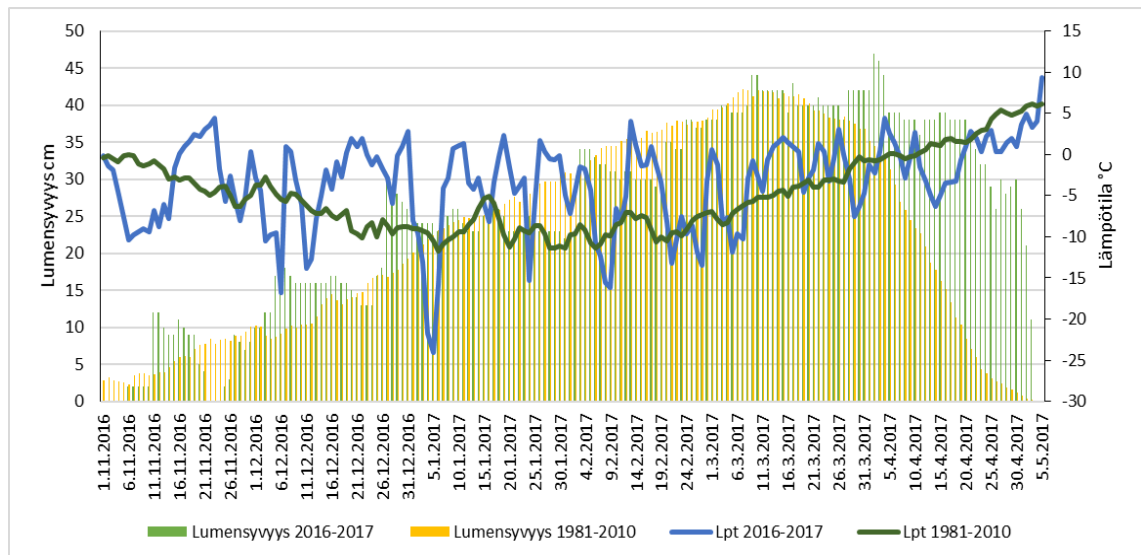
Syksy 2016 oli vertailujaksoon nähden leuto, terminen syksy alkoi noin viikkoa normaalia ajankohtaa myöhemmin, 16.9.2016 (Ilmatieteenlaitos 2018). Syksy jäi myös lyhyeksi, sillä terminen talvi alkoi vertailukauteen nähden normaaliin ajankohtaan 31.10–1.11.2016. Lokakuun keskilämpötila oli Maaningalla 3,3 °C ja Ruukissa 2,9 °C ja ne olivat hieman vertailujakson keskiarvoja alhaisempia, 3,9 °C ja 3,2 °C (Ilmatieteenlaitos 2017b). Timotein kylmänkaraistumista hyvin edistäviä päiviä (keskilämpötila alle +5 °C) oli syys-lokakuun aikana molemmissa koepaikoissa 28 (taulukko 3).

Taulukko 3. Karaistumispäivien (keskilämpötila alle +5 °C) kertyminen Maaningalla ja Ruukissa syksyllä 2016.

Karaistumispäivät	Syyskuu	Lokakuu	yhteensä
Maaninka	0	28	28
Ruukki	2	26	28



Kuva 8. Lumensyvyys (cm) ja keskilämpötila talven 2016–2017 aikana sekä vertailuajanjaksolla 1981–2010 Maaningalla.



Kuva 9. Lumensyvyys (cm) ja keskilämpötila talven 2016–2017 aikana sekä vertailuajanjaksolla 1981–2010 Ruukissa.

Talvi 2016–2017 oli leuto sekä Maaningalla, että Ruukissa. Marraskuun alussa lämpötila oli selvästi vertailukautta kylmempi, mutta sää lauhtui marraskuun puolessa välissä, jolloin myös ensilumi sulii pois. Pysyvä lumipeite (>0 cm) saatiin molemmilla mittauspäikoillä 25.11 (kuva 8 ja 9). Kylmin lämpötilajakso mitattiin molemmilla koepaikoilla välillä 4–6.1.2016 (kuva 8 ja 9). Kylmät jaksot olivat verrattain lyhyitä (alle viikon) ja sattuivat selvästi lumipeitteisinä aikoina. Ruukissa roudan paksuus oli suurempi kuin Maaningan mittausasemalla, jossa pysyvä lumi satoi lähes roudattomaan maahan.

10.2 Kasvuston korkeus, versotiheys ja kuiva-aine neliömetrillä

Syksyn pituuskasvumittauksissa lajikkeet eivät eronneet tilastollisesti merkitsevästi toisistaan Maaningalla (taulukko 4). Versopituus kasvoi tasaisesti typpitason noustessa ja typpilannoitustaso oli tilastollisesti merkitsevä muuttuja ($p = 0,007$). Tukeyn parivertailussa typpitasot 150- ja 250 kg N/ha erosivat merkitsevästi tasoista 350- ja 450 kg N/ha (taulukko 4). Ruukissa typpitaso ei vaikuttanut tilastollisesti merkitsevästi keskimääräiseen versopituuteen (taulukko 5).

Taulukko 4. Sekamallin varianssianalyysin tulokset Maaningan näytteiden kasvustohavainnoille syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Tilastollisesti merkitsevät erot ($p < 0,05$) on lihavoitu. Typpitason ja lajike * typpitaso yhdysvaikutuksen keskiarvovertailu on tehty Tukeyn testillä, jossa tulosten tilastollisesti merkitsevät erot ($p < 0,05$) on merkitty eri kirjaimin. * merkintä tarkoittaa, että selitettävälle muuttujalle on tehty logaritimuunnos, minkä vuoksi keskiarvon keskivirheitä ei voida esittää.

Lajike	Typpitaso kg/ha	Versopi- tuus syksy	Versoti- heys syksy	Versojen kuivamas- sa syksy	Versojen kuivamas- sa kevät	Elävät tyvet syksy	Elävät tyvet kevät	Kuolleet tyvet syksy	Kuolleet tyvet kevät	Talvituho- %
		cm	kpl / m ²	g ka / m ²	g ka / m ²	kpl / m ²	kpl / m ²	kpl / m ²	kpl / m ²	%
Grindstad		17,8	1683	125	47	2595	1742	837	1023	4,8
Nuutti		17,0	1709	111	43	2281	1685	1230	915	4,6
Keskiarvon keskivirhe		0,9	*	7	7	161	107	153	130	1,8
150	14,6	a	1482	a	75	ab	30	a	2537	ab
250	15,2	a	1429	a	76	a	37	ab	2053	a
350	19,4	ab	1647	a	115	b	50	ab	2209	ab
450	20,4	b	2370	b	205	c	64	b	2953	b
Keskiarvon keskivirhe	1,5	*		11	10	263	173	244	162	2,5
Grindstad	150	15,2	1504	78	34	2467	1971	1197	1414	0,9
Grindstad	250	14,8	1377	70	39	2100	1678	814	1033	0,5
Grindstad	350	18,8	1615	136	51	2549	1565	676	800	6,3
Grindstad	450	22,4	2397	216	65	3264	1753	661	843	11,5
Nuutti	150	14,0	1461	73	26	2607	2026	1352	1385	1,7
Nuutti	250	15,6	1483	83	36	2006	1447	1128	1031	0,3
Nuutti	350	20,0	1680	93	49	1869	1533	1093	522	12,3
Nuutti	450	18,3	2343	195	64	2643	1733	1348	722	4,3
Keskimäärin	17,4	1732	118	45	2438	1713	1034	969		4,7
Keskiarvon keskivirhe	2,3	*	18	15	408	268	374	214		3,0
P-arvot										
Lajike		0,54	0,83	0,16	0,61	0,17	0,70	0,06	0,28	0,93
Typpitaso		0,007	<0,001	<0,001	0,023	0,029	0,187	0,640	<0,001	0,003
Lajike * Typpitaso		0,37	0,95	0,21	0,99	0,52	0,91	0,82	0,72	0,07

Taulukko 5. Sekamallin varianssianalyysin tulokset Ruukin näytteiden kasvustohavainnoille syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Tilastollisesti merkitsevät erot ($p < 0,05$) on lihavoitu. * merkintä tarkoittaa, että selitettävälle muuttujalle on tehty logaritimuunnos, minkä vuoksi keskiarvon keskivirheitä ei voida esittää.

Lajike	Typpitaso kg/ha	Versopi- tuus syksy	Versoti- heys syksy	Versojen kuivamas- sa syksy	Versojen kuivamas- sa kevät	Elävät tyvet syksy	Elävät tyvet kevät	Kuolleet tyvet syksy	Kuolleet tyvet kevät	Talvituho- %
		cm	kpl / m ²	g ka / m ²	g ka / m ²	kpl / m ²	kpl / m ²	kpl / m ²	kpl / m ²	%
Grindstad	150	16,3	1929	118	29	2427	1308	843	1719	7,3
Grindstad	350	16,7	1742	94	26	2859	1071	1158	1259	20,3
Keskimäärin		16,5	1836	106	28	2643	1189	1001	1489	13,8
Keskiarvon keskivirhe		1,7	114	*	3	189	*	278	39	5,3
P-arvot										
Typpitaso		0,86	0,37	0,53	0,47	0,29	0,35	0,51	0,014	0,23

Maaningalla versotiheys neliometriä kohti nousi typpilannoituksen myötä ja typpitaso oli tilastollisesti erittäin merkitsevä muuttuja ($p < 0,001$), lajikevaikutusta ei ollut. Parivertailussa typpitaso 450 kg N/ha (suurin versotiheys) erosi tilastollisesti merkitsevästi muista lannoitustasoista (taulukko 4). Ruukissa 150- ja 350 kg N/ha typpilannoitustasot eivät eronneet tilastollisesti toisistaan (taulukko 5).

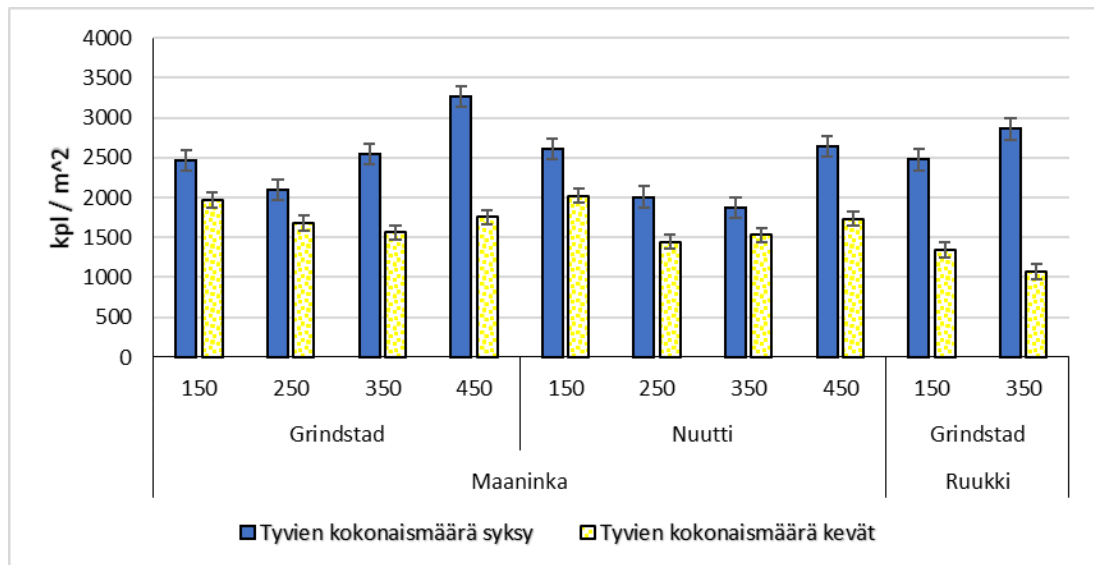
Syksyn kuiva-ainesato oli (g/m^2) suurin koejäsenellä, jota oli lannoitettu 450 kg N/ha lajikkeesta riippumatta. Typpitason vaikutus kuivasatoon oli yleisesti positiivinen ja tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p < 0,001$) (taulukko 4). Lajike ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja. Nuutilla typenlisäys 350:sta 450 kg N/ha tuotti lähes kaksi kertaa enemmän kuiva-ainetta. Parivertailussa typpitaso 250 kg N/ha erosi tilastollisesti merkitsevästi tasoista 350- ja 450 kg N/ha. Typpitaso 450 kg N/ha puolestaan erosi merkitsevästi kaikista muista tasoista (taulukko 4). Ruukissa typpilannoitustaso ei vaikuttanut kuiva-ainesatoihin tilastollisesti merkitsevästi (taulukko 5). Keväällä 2017 kasvustojen biomassa oli suurin korkeimmilla typpitasoilla ja typpilannoitustaso oli Maaningalla tilastollisesti merkitsevä muuttuja ($p = 0,023$). Parivertailussa typpitasot 150- ja 450 kg N/ha erosivat tilastollisesti toisistaan, lajikeroja ei ollut (taulukko 4). Ruukissa typpilannoitus ei vaikuttanut tilastollisesti merkitsevästi biomassan kokoon keväällä (taulukko 5).

10.3 Elävien tyvien lukumäärä, kuolleiden tyvien osuus ja kuivapaino

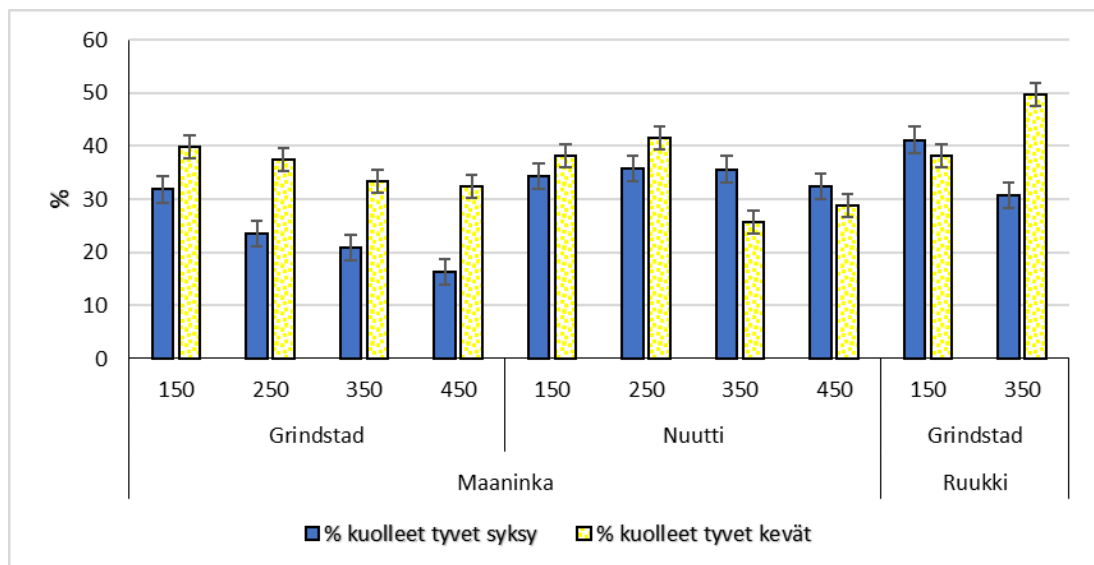
Syksyllä typpilannoitus vaikutti positiivisesti Maaningan elävin tyvien kokonaislukumäärään neliometrillä (tyveä/m^2) ja typpitaso oli tilastollisesti merkitsevä muuttuja ($p = 0,029$). Tukeyn parivertailussa typpitasot 250- ja 350 kg N/ha erosivat merkitsevästi korkeimmasta tasosta 450 kg N/ha, jolla myös laskettiin suuriin keskimääräinen tyvimäärä, 2953 tyveä/m^2 (taulukko 4). Ruukissa typen lisäys nosti elävien tyvien lukumäärää, mutta ero ei ole tilastollisesti merkitsevä (taulukko 5).

Keväällä typpilannoitus ei vaikuttanut elävien tyvien kokonaislukumäärään neliometrillä kummallakaan koepaikalla (taulukot 4 ja 5). Ruukissa elävien tyvien kokonaismäärä pieneni lisättäessä typpilannoitusta 150 kg:sta 350 kilogrammaan. Tämä voi johtua siitä,

että kuolleiden tyvien kokonaismäärä nousi vastaavasti 30 prosentista 50 prosenttiin (kuva 11) Maaningalla kevään elävien tyvien lukumäärä oli noin 31 % pienempi kuin syksyllä (kuva 10), ja kuolleiden tyvien %-osuus kaikista tyvistä nousi prosentilla (34 prosentista 35 prosenttiin). Kuolleiden tyvien kokonaismäärä kasvoi Grindstadilla 22 prosenttia ja Nuutilla määrä väheni 26 prosenttia. Ruukissa elävien tyvien määrä putosi talven aikana noin 55 % ja kuolleiden osuus vastaavasti nousi 36 prosentista 46 prosenttiin (kuva 11).

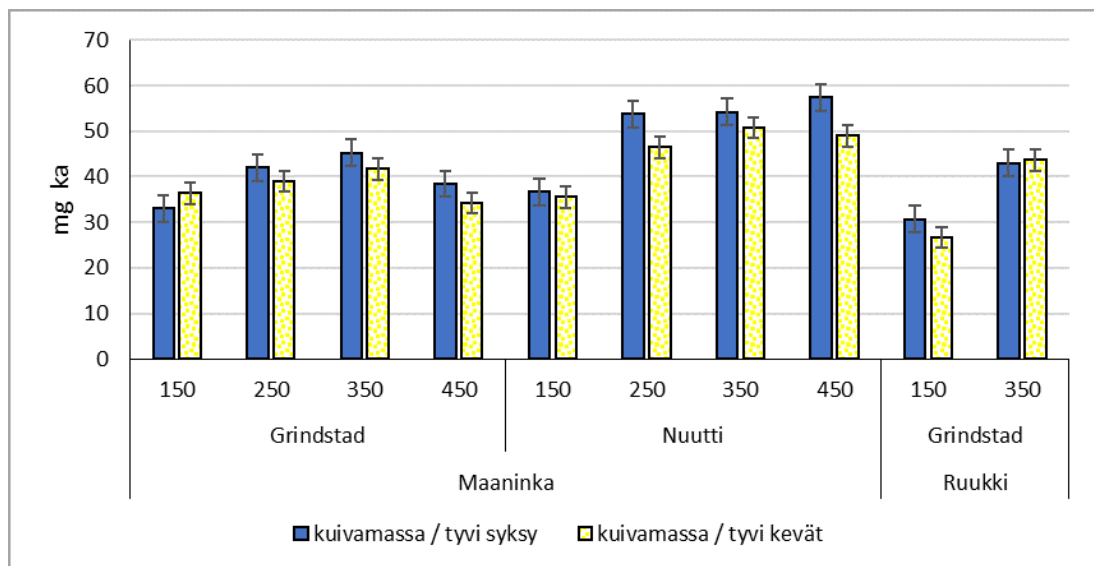


Kuva 10. Timoteilajikkeiden Grindstad ja Nuutti elävien tyvien kokonaismäärät neliömetrillä (kpl / m²) Maaningalla ja Ruukissa syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina (\pm SEM, Maaninka n=4, Ruukki n=3)



Kuva 11. Timoteilajikkeiden Grindstad ja Nuutti kuolleiden tyvien osuus kokonaistyvymäärästä (%) Maaningalla ja Ruukissa syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina (\pm SEM, Maaninka n=4, Ruukki n=3)

Maaningalla sekä typpilannoitus, että lajike vaikuttivat elävien tyvien keskimääräiseen kuivapainoon syksyllä 2016 (kuva 10). Lajike oli tilastollisesti merkitsevä ($p=0,001$) kuten myös typpilannoitus ($p=0,015$). Typpi lisäsi tyvien kuivapainoa, Nuutilla tyvien kuivapaino oli keskimäärin 51 mg, Grindstadilla 40 mg. Tukeyn parivertailussa typpilannoitustaso 150 kg N/ha erosi merkitsevästi muista typpitasoista, suurin kuivapaino oli typpitasolla 350 kg N/ha (taulukko 6). Ruukissa typpi lisäsi elävien tyvien kuivapainoa, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä (taulukko 7). Maanigan kevätnäytteissä lajike vaikutti tilastollisesti merkitsevästi elävien tyvien kuivapainoon ($p=0,020$), typpilannoitustaso ei (taulukko 6). Prosentuaalisesti tyvien kuivapaino laski syksystä Nuutilla 13 prosenttia, Grindstadilla viisi prosenttia. Ruukissa typpitaso oli tilastollisesti merkitsevä muuttuja ($p=0,039$) ja tyvien kuivapainot kasvoivat korkeammalla 350 kg N/ha lannoitustasolla (taulukko 7). Syksyyn verrattuna tyvien massa aleni tasolla 150 kg N/ha 32 prosenttia ja 350 kg tasolla sipulien massa muista havainnosta poiketen kasvoi noin 4 prosenttia (kuva 12).



Kuva 12. Timoteilajikkeiden Grindstad ja Nuutti tyvien kuivamassat (g ka/tyvi) Maaningalla sekä Ruukissa syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina (\pm SEM, Maaninka $n=4$, Ruukki $n=3$)

10.4 Talvituhot

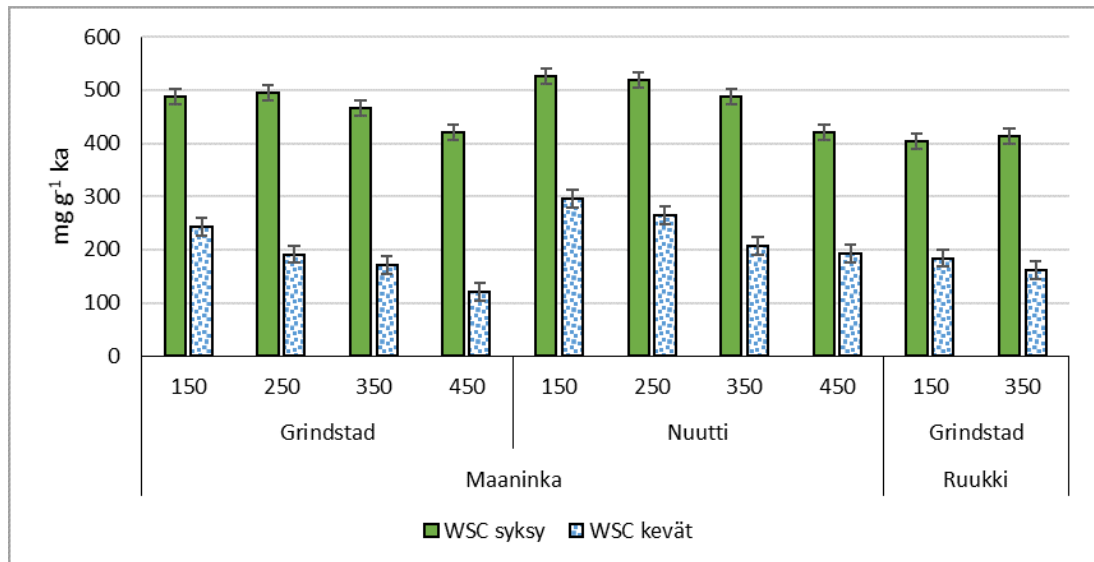
Typpilannoituksen lisäys kasvatti Maanigan koeruutujen talvituhoja keväällä 2017 ($p=0,003$). Lajike-eroja ei ollut. (taulukko 4). Parivertailussa typpilannoitustaso 150 kg N/ha erosi tilastollisesti merkitsevästi tasosta 350 kg N/ha. Typpilannoitustaso 250 kg

puolestaan erosi merkitsevästi tasoista 350- ja 450 kg N/ha. Ruukissa talvituhot olivat keskimäärin korkeampia kuin Maaningalla. Typpilannoitus nosti talvituhojen määrää, mutta ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä (taulukko 5).

10.5 Vesiliukoiset sokerit

Maaningalla syksyllä 2016 vesiliukoisten sokerien pitoisuus oli keskimäärin 478 mg/g ka ja pitoisuus aleni typpilannoitusmäärien kasvaessa ($p < 0,001$, kuva 13). Lajikevaikutusta ei ollut (taulukko 6). Tukeyn parivertailussa typpitaso 450 kg N/ha erosi merkitsevästi muista typpitasoista. Ruukissa liukoisten sokerien pitoisuuksien keskiarvo oli 409 mg/g ka, typpilannoitustaso ei vaikuttanut merkitsevästi sokerien määrään (taulukko 7).

Keväällä 2017 liukoisten sokerien pitoisuus oli Maaningalla keskimäärin 209 mg/g ka, mikä on noin 56 prosenttia vähemmän kuin syksyllä. Sekä lajike, että typpitaso ($p < 0,001$) olivat tilastollisesti erittäin merkitseviä muuttujia (taulukko 6). Nuutilla liukoisten sokerien pitoisuus oli pysynyt talven yli korkeampana kuin Grindstadilla, ollen keskimäärin 237 mg/g ka. Grindstadilla pitoisuus oli noin 23 prosenttia pienempi, keskimäärin 181 mg/g ka (kuva 13). Typpilannoitustason parivertailussa typpitaso 450 kg N/ha erosi tilastollisesti tasoista 150- ja 250 kg N/ha (taulukko 6). Ruukissa liukoisten sokerien pitoisuus oli pudonnut syksystä 58 prosenttia ollen keskimäärin noin 172 mg/g ka (taulukko 7). Typpitaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja, liukoisten sokerien pitoisuus oli hieman suurempi typpitasolla 150 kg N/ha (kuva 13).



Kuva 13. Timoteilajikkeiden Grindstad ja Nuutti liukoisten varastosokerien pitoisuudet ($\text{mg g}^{-1} \text{ ka}$) versojen tyvissä Maaningalla sekä Ruukissa syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina (\pm SEM, Maaninka $n=4$, Ruukki $n=3$)

Vesiliukoisten sokerien määrä timotein tyveä kohti oli syksyllä Maaningalla keskimäärin 21,5 mg. Lajike ja typpitaso olivat tilastollisesti merkitseviä muuttujia arvoilla $p=0,002$ ja $p=0,030$ (taulukko 6). Lajikkeista Nuutilla tyven sokerimäärä oli keskimäärin 24,4 mg ja Grindstadilla 18,6 mg. Typpitason parivertailussa typpitaso 150 kg N/ha erosi merkitsevästi tasosta 250 kg N/ha. Ruukissa keskimääräinen sokerimäärä tyveä kohti oli 15,1 mg, typpitaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja (taulukko 7).

Keväällä liukoisten sokerien määrä elävää tyveä kohti oli Maaningalla keskimäärin 9,4 mg, noin 56 % pienempi kuin syksyllä. Lajikkeella oli tilastollisesti erittäin merkitsevä ($p<0,001$) ja typpitasolla merkitsevä ($p=0,041$) vaikutus tyvien sokerimääriin (taulukko 6). Nuutilla sokerimäärä oli keskimäärin 11,6 mg, Grindstadilla 7,2 mg. Typpitason parivertailussa typpitaso 250 kg N/ha erosi merkitsevästi tasosta 450 kg N/ha (taulukko 6). Ruukissa sokerimäärä oli keskimäärin 6,6 mg. Laskua syksystä oli noin 56 prosenttia. Typpitaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja (taulukko 7).

Neliömetrin alalle laskettu liukoisten sokerien kokonaismäärä oli syksyllä Maaningalla noin $50,7 \text{ g/m}^2$. Lajike ja typpitaso eivät olleet tilastollisesti merkitseviä muuttujia. Typpilannoitustaso lisäsi sokereiden määrää, suurin määrä Nuutilla tasolla 450 kg N/ha, $63,5 \text{ g/m}^2$ (taulukko 6). Ruukissa neliömetrin sokerimäärä oli keskimäärin $40,8 \text{ g/m}^2$. Typpitaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja (taulukko 7).

Keväällä vesiliukoisten sokerien määrä neliömetrillä oli Maaningalla keskimäärin 15,7 g/m², noin 69 prosenttia vähemmän kuin syksyllä. Lajike oli tilastollisesti erittäin merkitsevä arvolla $p < 0,001$. Typpitaso oli merkitsevä arvolla $p = 0,020$ (taulukko 6). Grindstadilla keskimääräinen sokerimäärä oli 12,3 g/m², Nuutilla 19,2 g/m². Prosentuaalisesti sokerimäärät olivat laskeneet syksystä Grindstadilla 73 prosenttia ja Nuutilla 65 prosenttia. Typpitason parivertailussa typpitaso 150 kg N/ha erosi merkitsevästi tasosta 450 kg N/ha (taulukko 6). Ruukissa liukoisten sokerien määrä neliömetrille oli keväällä keskimäärin 7 g/m², typpitaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja. Sokerien määrä laski syksystä noin 83 prosenttia (taulukko 7).

Taulukko 6. Sekamallin varianssianalyysin tulokset Maaningan näytteiden sokerianalyyseistä ja tyvien kuivapainoista syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Tilastollisesti merkitsevät erot ($p < 0,05$) on lihavoitu. Typpitason ja lajike * typpitaso yhdysvaikutuksen keskiarvovertailu on tehty Tukeyn testillä, jossa tulosten tilastollisesti merkitsevät erot ($p < 0,05$) on merkitty eri kirjaimin. * merkintä tarkoittaa, että selitettävälle muuttujalle on tehty logaritimuunnos, minkä vuoksi keskiarvon keskivirheitä ei voida esittää.

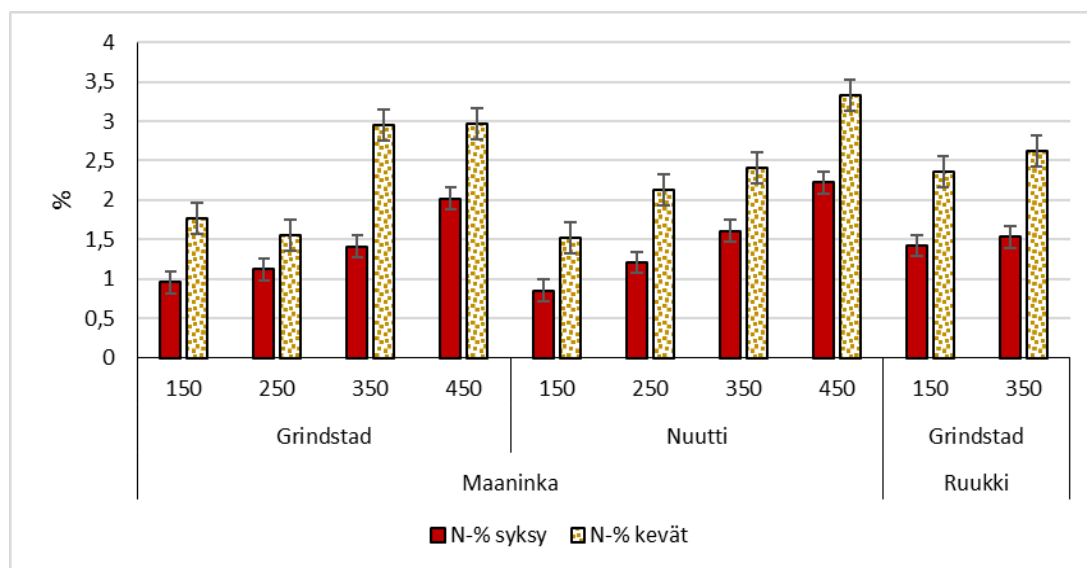
Lajike	Typpitaso kg/ha	WSC syksy	WSC kevät	WSC / tyvi syksy	WSC / tyvi kevät	WSC / m ² syksy	WSC / m ² kevät	Kuivamas- sa / tyvi syksy	Kuivamas- sa / tyvi kevät
		mg / g ka	mg / g ka	mg	mg	g / m ²	g / m ²	mg ka	mg ka
Grindstad		468	181,4	18,6	7,2	46,9	12,3	40	37
Nuutti		489	236,8	24,4	11,6	54,4	19,2	51	45
Keskiarvon keskivirhe		9	15	1,1	0,9	3,4	0,9	2	4
	150	508	b 262	c 17,7	a 9,0	ab 44,1	18,6	b 35	a 34
	250	507	b 228	bc 24,4	b 11,1	ab 49,9	16,9	ab 48	b 43
	350	477	b 189	ab 23,8	ab 9,6	ab 51,7	14,0	ab 50	b 46
	450	421	a 157	a 20,2	ab 7,8	a 60,0	13,2	a 48	b 42
Keskiarvon keskivirhe		14	20	1,9	1,2	5,6	1,4	3	5
Grindstad	150	488	242	16,1	8,0	39,1	15,5	33	35
Grindstad	250	496	191	20,9	8,1	44,1	13,4	42	39
Grindstad	350	466	171	21,1	7,9	53,9	12,0	45	42
Grindstad	450	422	121	16,4	4,6	50,5	8,1	38	34
Nuutti	150	529	283	19,4	9,9	49,2	21,7	37	32
Nuutti	250	518	265	27,9	14,2	55,6	20,5	54	47
Nuutti	350	488	207	26,5	11,2	49,4	16,1	54	51
Nuutti	450	420	193	24,0	10,9	63,5	18,3	57	49
Keskimäärin		478	209	21,5	9,4	50,7	15,7	45	41
Keskiarvon keskivirhe		21	24	2,9	1,7	8,7	2,2	5	6
P-arvot									
Lajike		0,06	<0,001	0,002	<0,001	0,13	<0,001	0,001	0,020
Typpitaso		<0,001	<0,001	0,030	0,041	0,35	0,020	0,015	0,07
Lajike * Typpitaso		0,60	0,63	0,796	0,21	0,48	0,30	0,34	0,28

Taulukko 7. Sekamallin varianssianalyysin tulokset Ruukin näytteiden sokerianalyyseistä ja tyvien kuivapainoista syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Tilastollisesti merkitsevät erot ($p < 0,05$) on lihavoitu. * merkintä tarkoittaa, että selitettävälle muuttujalle on tehty logaritmimuunnos, minkä vuoksi keskiarvon keskivirheitä ei voida esittää.

Lajike	Typpitaso kg/ha	WSC syksy	WSC kevät	WSC / tyvi syksy	WSC / tyvi kevät	WSC / m ² syksy	WSC / m ² kevät	Kuivamas- sa / tyvi syksy	Kuivamas- sa / tyvi kevät
		mg / g ka	mg / g ka	mg	mg	g / m ²	g / m ²	mg ka	mg ka
Grindstad	150	405	184	12,9	5,8	31,4	7,2	31	27
Grindstad	350	413	161	17,2	7,4	50,2	6,8	43	44
Keskimäärin		409	172	15,1	6,6	40,8	7,0	37	36
Keskiarvon keskivirhe		20	36	2,1	2,3	7,8	*	4	4
P-arvot									
Typpitaso		0,75	0,69	0,19	0,67	0,21	0,86	0,16	0,039

10.6 Tyvien kokonaistyyppi

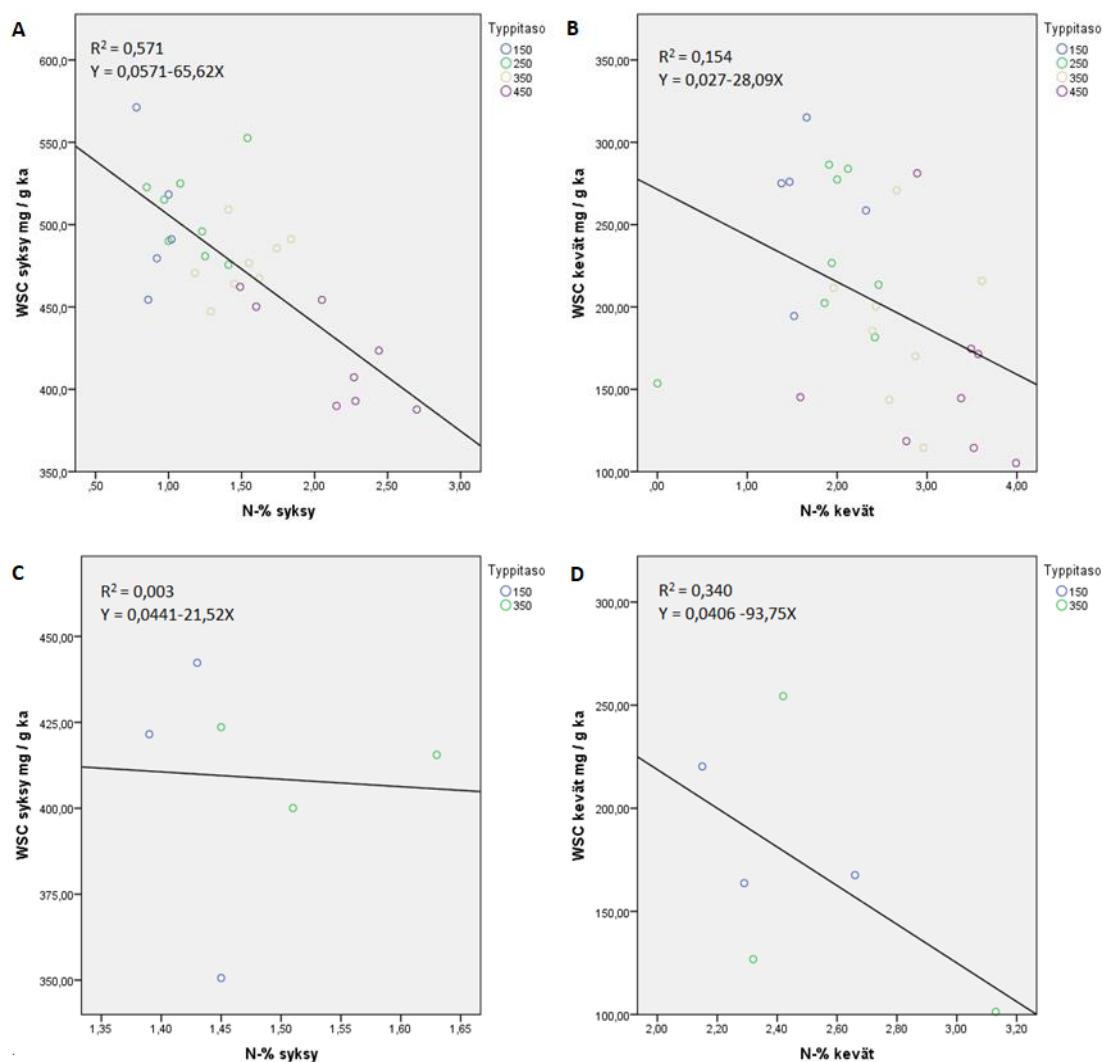
Maaningalla elävien tyvien kuiva-aineesta kokonaistypen osuus vaihteli syksyllä 0,9–2,3 prosentin ja keväällä 1,5–3,3 prosentin välillä (kuva 14). Ruukissa vastaavat luvut olivat 1,4–1,5 prosenttia ja 2,4–2,6 prosenttia (kuva 14).



Kuva 14. Timoteilajikkeiden Grindstad ja Nuutti elävien tyvien typpipitoisuus (N-% ka) Maaningalla sekä Ruukissa syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Tulokset ilmoitettu keskiarvoina (\pm SEM, Maaninka $n=4$, Ruukki $n=3$)

Maaningalla tyvien typpipitoisuus (N-%) korreloi syksyllä negatiivisesti liukoisten sokerien (WSC) kanssa (kuva 15). Syksyllä (Pearsonin korrelaatiokerroin $-0,755$, $p < 0,001$). Regressiosuoralla tyvien typpipitoisuus selitti liukoisten sokerien arvoista noin 57 prosenttia. Keväällä korrelaatiokerroin sai arvon $-0,392$ ollen tilastollisesti merkitsevä ($p=0,035$). Regressiosuoralla typpipitoisuus selitti liukoisten sokerien arvojen vaihtelusta enää 15 prosenttia.

Ruukissa liukoisten sokerien ja tyvien typpipitoisuuksien välille ei löydetty tilastollisesti merkitsevää korrelaatiota syksyllä (Pearsonin korrelaatiokerroin $-0,057$, $p=0,91$) eikä keväällä (Pearsonin korrelaatiokerroin $-0,538$, $p=0,23$). Liukoisten sokerien regressioanalyysit on koottu liitteeseen kuusi.



Kuva 15. Vesiliukoisten sokerien (mg / g ka) ja tyvien kokonaistypen (N-%) lineaariset regressiosuorat, joissa regressioyhtälö ja sen selitysaste (R^2). A Maaninka syksy- B kevät, - C Ruukki syksy D, Ruukki. Havaintoparien lukumäärä Maaningalla $n=29$, Ruukissa $n=6$.

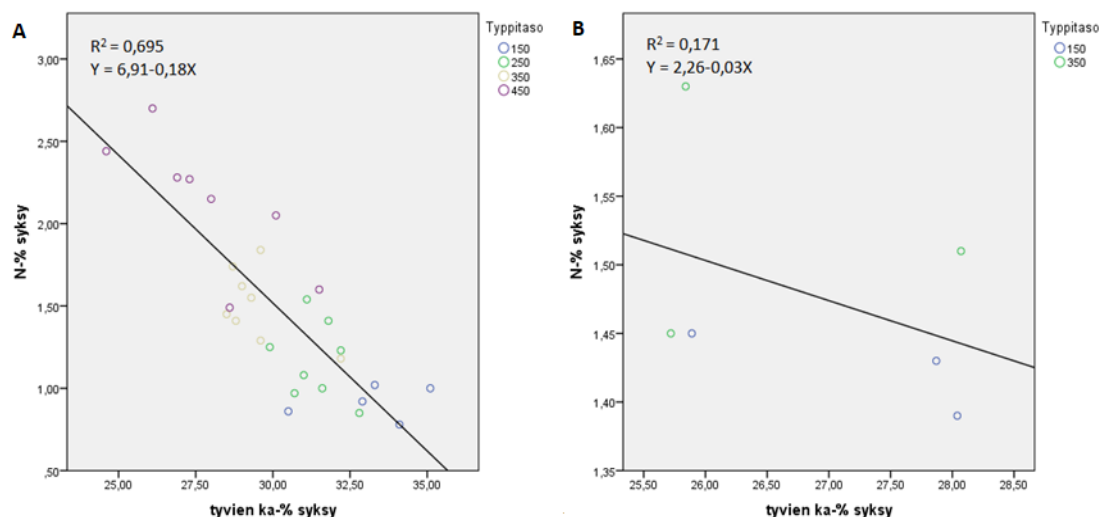
Elävien tyvien laskennallinen kokonaistypin määrä (mg N) oli Maaningan syysnäytteissä keskimäärin 0,70 mg. Lajike oli tilastollisesti merkitsevä arvolla $p=0,0039$ ja typpilannoitustaso erittäin merkitsevä arvolla $p<0,001$ (taulukko 8). Typpilannoitus lisäsi kokonaistypen määrää, Nuutilla keskimääräinen typpimäärä oli 0,67 mg ja Grindstadilla 0,50 mg. Typpitason parivertailussa tasot 150- ja 250 kg N/ha erosivat tilastollisesti

toisistaan, sekä tasoista 350- ja 450 kg N/ha. Suurin määrä oli Nuutilla, typpitasolla 450 kg N/ha (1,24 mg). Ruukissa typpitaso ei syksyllä ollut tilastollisesti merkitsevä ja keskimääräinen typpimäärä tyvessä oli 0,55 mg (taulukko 9).

Kevätnäytteissä keskimääräinen kokonaistypen määrä tyvissä oli Maaningalla 0,98 mg. Määrä oli 29 prosenttia suurempi kuin syksyllä. Typpilannoitustaso oli tilastollisesti merkitsevä ($p=0,002$), lajikevaikutusta ei ollut (taulukko 8). Typpi lisäsi kokonaistypen määrää ja parivertailussa typpitasot 150- ja 250 kg N/ha erosivat tasoista 350- ja 450 kg N/ha. Ruukissa typpitaso oli tilastollisesti merkitsevä arvolla $p=0,01$. Tyvien kokonaistypen määrä oli keskimäärin 0,87 mg (taulukko 9).

Syksyllä timotein tyvien kokonaistypymäärä neliömetrillä oli Maaningalla keskimäärin $1,63 \text{ g/m}^2$. Typpilannoitustaso oli tilastollisesti erittäin merkitsevä arvolla $p<0,001$, lajikevaikutusta ei ollut (taulukko 8). Typpilannoitustaso lisäsi kokonaistypen määrää ja parivertailussa typpitaso 450 kg N/ha erosi merkitsevästi kaikista muista typpitasoista. Ruukissa kokonaistypen määrä neliömetrillä oli syksyllä keskimäärin $1,49 \text{ g/m}^2$. Typpilannoitustaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja (taulukko 9). Keväällä Maaningan kokonaistypymäärä neliömetrillä oli keskimäärin $1,64 \text{ g/m}^2$. Typpilannoitustaso oli tilastollisesti merkitsevä muuttuja arvolla $p=0,020$, lajikevaikutusta ei ollut. Typpi lisäsi kokonaistypen määrää ja parivertailussa typpitaso 450 kg N/ha erosi merkitsevästi tasoista 150- ja 250 kg N/ha (taulukko 8). Ruukin kevätnäytteissä tyvien kokonaistypen määrä neliömetrillä oli keskimäärin $1,03 \text{ g/m}^2$. Typpitaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja (taulukko 9).

Syksyllä Maaningan tyvien kuiva-ainepitoisuus (ka-%) korreloi negatiivisesti (Pearsonin korrelaatiokerroin -0,83; F-testi $p<0,001$) kokonaistypipitoisuuden (N-%) kanssa (kuva 16). Syksyllä. Regressiosuoralla kuiva-ainepitoisuus selitti tyvien typpipitoisuuden arvoista noin 70 prosenttia. Ruukissa korrelaatiokerroin oli puolestaan -0,41, mutta tulos ei ollut tilastollisesti merkitsevä ($p=0,41$).



Kuva 16. Timotein elävien tyvien kokonaistyyppipitoisuuden (N-%) ja kuiva-ainepitoisuuden (ka-%) regressiosuorat, joissa regressioyhtälö ja sen selitysaste (R^2). A Maaninka syksy. B Ruukki syksy. Havaintoparien lukumäärä Maaningalla $n=29$, Ruukissa $n=6$.

10.7 Liukoiset proteiinit

Syksyllä liukoisten proteiinien määrä timotein elävissä tyvissä oli Maaningalla keskimäärin 0,45 mg. Sekä lajike, että tyypilannoitustaso olivat merkitseviä muuttujia arvoilla $p=0,001$ ja $p=0,004$ (taulukko 8). Tyypilannoitus kasvatti proteiinien määrää ja Tukeyn parivertailussa typpitaso 150 kg N/ha erosi tilastollisesti muista tasoista. Suurin liukoisten proteiinien määrä oli typpitasolla 450 kg N/ha. Grindstadin liukoisten proteiinien määrä oli keskimäärin 0,39 mg, Nuutilla 0,51 mg. Ruukissa keskimääräinen liukoisten proteiinien määrä oli 0,37 mg, tyypilannoitustaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja. Typpitaso kasvatti hieman liukoisten proteiinien määrää (taulukko 9).

Keväällä liukoisten proteiinien määrä elävissä tyvissä oli Maaningalla keskimäärin 1,42 mg ja hieman yli kolminkertainen syksyyn verrattuna. Lajike ja tyypilannoitustaso olivat tilastollisesti erittäin merkitseviä arvoilla $p<0,001$ (taulukko 8). Näiden kahden muuttujan yhdysvaikutusarvo oli myös merkitsevä ($p=0,002$). Yhdysvaikutuksen parivertailussa Grindstad-lajikkeen proteiinimäärät eivät eronneet tilastollisesti toisistaan. Nuutin typpitasot 350- ja 450 kg N/ha erosivat tilastollisesti kaikista Grindstadeista ja Nuutin tasoista 150- ja 250 kg N/ha (taulukko 8). Ruukissa keskimääräinen proteiinimäärä oli 0,98 mg, tyypilannoitustaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja (taulukko 9).

Syksyllä liukoisten proteiinien määrä neliömetrille oli Maaningalla keskimäärin 1,07 g m⁻² (taulukko 8). Typpilannoitustaso oli merkitsevä muuttuja (p=0,003), lajikevaikutusta ei ollut. Typpilannoitus kasvatti proteiinien määrää ja parivertailussa typpitasot 150- ja 250 kg N/ha erosivat tilastollisesti tasosta 450 kg N/ha, jonka liukoisten proteiinien määrä oli 1,45 g/m² (taulukko 8). Ruukissa liukoisten proteiinien määrä neliömetrille oli 0,99 g/m², typpitaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja (taulukko 9).

Keväällä tyvien liukoisten proteiinin määrä neliömetrillä oli Maaningalla keskimäärin 2,33 g/m² (taulukko 8). Typpilannoitustaso ja lajike olivat tilastollisesti merkitseviä muuttujia arvoilla p= 0,001 ja p=0,005. Yhdysvaikutus oli myös merkitsevä (p=0,016). Parivertailussa kaikki Grindstadin typpitasot erosivat merkitsevästi Nuutin tasosta 450 kg N/ha, samoin Nuutin typpitasot 150- ja 250 kg N/ha erosivat toisistaan (taulukko 8). Ruukissa proteiinien määrä oli keskimäärin 1,2 g/m², typpilannoitustaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä tekijä (taulukko 9).

Taulukko 8. Sekamallin varianssianalyysin tulokset Maaningan näytteiden proteiini- ja kokonaistyyppianalyyseistä syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Tilastollisesti merkitsevät erot (p<0,05) on lihavoitu. Typpitason ja lajike * typpitaso yhdysvaikutuksen keskiarvovertailu on tehty Tukeyn testillä, jossa tulosten tilastollisesti merkitsevät erot (p<0,05) on merkitty eri kirjaimin. * merkintä tarkoittaa, että selitettävälle muuttujalle on tehty logaritimuunnos, minkä vuoksi keskiarvon keskivirheitä ei voida esittää.

Lajike	Typpitaso kg/ha	Liuk. Prot. / tyvi syksy	Liuk. Prot. / tyvi kevät	Liuk. Prot. / m ² syksy	Liuk. Prot. / m ² kevät	kok. N / tyvi syksy	kok. N / tyvi kevät	kok. N / m ² syksy	kok. N / m ² kevät
		mg	mg	g / m ²	g / m ²	mg	mg	g / m ²	g / m ²
Grindstad		0,39	1,1	1,00	1,84	0,50	0,88	1,47	1,51
Nuutti		0,5	1,6	1,15	2,55	0,67	1,07	1,79	1,77
Keskiarvon keskivirhe		0,03	*	0,08	*	*	0,12	0,18	0,21
	150	0,32	a	0,76	0,82	a	0,30	a	1,15
	250	0,46	b	1,28	0,94	a	0,53	b	1,24
	350	0,50	b	1,62	1,08	a	0,74	c	1,85
	450	0,51	b	1,78	1,45	b	0,97	c	2,31
Keskiarvon keskivirhe		0,04	*	0,13	*	*	0,17	0,29	0,33
Grindstad	150	0,31	0,85	ab	0,77	1,66	a	0,30	0,63
Grindstad	250	0,40	1,17	b	0,84	1,95	a	0,45	0,62
Grindstad	350	0,45	1,18	b	1,12	1,84	a	0,63	1,24
Grindstad	450	0,40	1,17	b	1,27	1,94	a	0,76	1,02
Nuutti	150	0,33	0,68	a	0,87	1,40	a	0,30	0,47
Nuutti	250	0,52	1,40	b	1,05	2,02	a	0,63	0,99
Nuutti	350	0,56	2,22	cd	1,03	3,24	ab	0,87	1,20
Nuutti	450	0,62	2,71	d	1,63	4,63	b	1,24	1,61
Keskimäärin		0,45	1,42		1,07	2,34	0,65	0,98	1,63
Keskiarvon keskivirhe		0,06	*		0,19	*	*	0,25	0,44
P-arvot									
Lajike		0,001	<0,001	0,18	0,009	0,004	0,16	0,18	0,34
Typpitaso		0,004	<0,001	0,003	0,005	<0,001	0,002	<0,001	0,020
Lajike * Typpitaso		0,23	0,002	0,42	0,016	0,33	0,18	0,43	0,38

Taulukko 9. Sekamallin varianssianalyysin tulokset Maaningan näytteiden proteiini- ja kokonaistyyppianalyyseistä syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Tilastollisesti merkitsevät erot ($p < 0,05$) on lihavoitu. * merkintä tarkoittaa, että selitettävälle muuttujalle on tehty logaritmuunnos, minkä vuoksi keskiarvon keskivirheitä ei voida esittää.

Lajike	Typpitaso kg/ha	Liuk. Prot. / tyvi syksy	Liuk. Prot. / tyvi kevät	Liuk. Prot. / m ² syksy	Liuk. Prot. / m ² kevät	kok. N / tyvi syksy	kok. N / tyvi kevät	kok. N / m ² syksy	kok. N / m ² kevät
		mg	mg	g / m ²	g / m ²	mg	mg	g / m ²	g / m ²
Grindstad	150	0,31	0,75	0,76	1,02	0,44	0,63	1,55	0,95
Grindstad	350	0,43	1,22	1,22	1,38	0,66	1,12	1,42	1,10
Keskimäärin		0,37	0,98	*	1,20	0,55	0,87	1,48	1,03
Keskiarvon keskivirhe		0,04	*	0,99	0,24	0,10	*	0,38	0,17
P-arvot									
Typpitaso		0,14	0,14	0,08	0,40	0,29	0,010	0,70	0,57

10.8 SDS-PAGE

Maaningalla 75-kDa kokoinen polypeptidi muodosti liukoisten proteiinien kokonaisfraktiosta noin 10 prosenttia ja lajike ($p=0,001$) sekä typpilannoitustaso ($p=0,012$) olivat molemmat tilastollisesti merkitseviä muuttujia. Lajikkeista Grindstadilla fraktion osuus oli suurempi kuin Nuutilla ja typpilannoitustaso 450 kg N/ha laski fraktion osuutta. Myös päämuuttujien yhdysvaikutus oli tilastollisesti erittäin merkitsevä arvolla $p < 0,001$. Lajiketasolla 75-kDa muodosti Grindstadin proteiinifraktioista noin 10,5 %, Nuutilla 9 prosenttia. Parivertailussa Grindstad 450 kg N/ha erosi merkitsevästi Grindstadin muista typpilannoitustasoista (pienempi fraktio), sekä Nuutin 350 kg N/ha tasosta. Nuutin 150, 250 ja 450 kg N/ha erosivat tilastollisesti Grindstadin kolmesta ensimmäisestä typpitasosta (suuremmat fraktiot, taulukko 10). Ruukissa typpitaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja (taulukko 11).

41-kDa oli suurin yksittäinen proteiinifraktio; sen osuus kokonaisintensiteetistä oli Maaningalla keskimäärin 19,7 prosenttia. Typpilannoitustaso tai lajike eivät vaikuttaneet tilastollisesti merkitsevästi fraktioiden osuuteen (taulukko 10) Ruukissa keskimääräinen 41-kDa-fraktion suuruus oli keskimäärin 21,4 %. Typpilannoitustaso ei vaikuttanut merkitsevästi fraktion suuruuteen (taulukko 11).

19-kDa muodosti toiseksi suurimman yksittäisen proteiinifraktio, jonka osuus kokonaisintensiteetistä oli Maaningalla keskimäärin 17 prosenttia. Lajike ja typpilannoitustaso olivat tilastollisesti merkitseviä arvoilla ($p < 0,001$ ja $p = 0,001$) Grindstadilla fraktion suuruus oli 15,3 %, Nuutilla 19,2 %. Typpilannoitustasojen parivertailussa 150 kg N/ha erosi merkitsevästi tasoista 350- ja 450 kg N/ha.

Typpilannoitustaso 250 kg N/ha erosi taas merkitsevästi tasosta 350 kg N/ha (taulukko 10). Ruukissa 19-kDa-fraktion osuus oli keskimäärin 17 prosenttia. Typpilannoitustaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja (taulukko 11).

14-kDa oli molekyylikooltaan pienin tarkasteltava fraktio ja sen osuus kokonaisintensiteetistä oli Maaningalla 10,5 prosenttia. Typpitaso oli tilastollisesti merkitsevä ($p=0,044$), lajike ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja. Typpilannoitus lisäsi fraktion %-osuutta ja parivertailussa typpitaso 150 kg N/ha erosi merkitsevästi tasosta 450 kg N/ha (taulukko 10). Ruukissa 14-kDa-fraktion osuus oli keskimäärin 14,5 prosenttia. Typpitaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä muuttuja (taulukko 11).

Maaningalla fraktioiden 21-26-kDa summa kokonaisintensiteetistä oli keskimäärin 13,1 prosenttia. Lajike oli tilastollisesti merkitsevä muuttuja arvolla $p=0,032$, typpitaso ei. Lajikkeen ja typpilannoitustason yhteisvaikutus oli myös merkitsevä arvolla $p=0,0094$. Grindstadilla keskimääräinen fraktion osuus oli 14,4 %, Nuutilla 11,8 %. Yhdysvaikutuksen parivertailussa Grindstadin typpitaso 150 kg N/ha erosi merkitsevästi Nuutin tasosta 250 kg N/ha (taulukko 10). Ruukissa 21–26-kDa-fraktioiden osuus oli keskimäärin 10 prosenttia. Typpilannoitustaso ei ollut tilastollisesti merkitsevä (taulukko 11).

Taulukko 10. Sekamallin varianssianalyysin tulokset Maaningan näytteiden SDS-PAGE tuloksille syksyllä 2016. Tilastollisesti merkitsevät erot ($p < 0,05$) on lihavoitu. Tyypitason ja lajike * tyypitaso yhdysvaikutuksen keskiarvovertailu on tehty Tukeyn testillä, jossa tulosten tilastollisesti merkitsevät erot ($p < 0,05$) on merkitty eri kirjaimin. * merkintä tarkoittaa, että selitettävälle muuttujalle on tehty logaritminmuunnos, minkä vuoksi keskiarvon keskivirheitä ei voida esittää.

Lajike	Typpitaso kg/ha	75-kDa	41-kDa	19-kDa	14-kDa	21-26-kDa			
		%	%	%	%	%			
Grindstad		10,5	19,8	15,3	10,3	14,4			
Nuutti		9,0	19,7	19,2	10,7	11,8			
Keskiarvon keskivirhe		0,3	0,9	0,7	0,7	0,8			
150		9,8	20,4	20,5	c	8,4	a	13,6	
250		9,5	20,0	18,2	bc	10,1	ab	13,3	
350		11,1	20,0	14,3	a	10,7	ab	14,2	
450		8,5	18,6	16,1	ab	12,7	b	11,1	
Keskiarvon keskivirhe		0,5	1,5	1,1		1,2		1,3	
Grindstad	150	11,8	b	19,9	17,1	8,2		17,4	b
Grindstad	250	11,1	b	20,9	15,8	9,1		16,4	ab
Grindstad	350	10,3	b	20,7	13,5	10,5		12,6	ab
Grindstad	450	8,8	a	17,8	14,8	13,3		11,1	ab
Nuutti	150	7,8	a	21,0	23,8	8,5		9,9	a
Nuutti	250	8,0	a	19,0	20,5	11,0		10,3	ab
Nuutti	350	11,8	b	19,3	15,2	10,9		15,9	ab
Nuutti	450	8,2	a	19,4	17,4	12,2		11,1	ab
Keskimäärin		9,7		19,7	17,3	10,5		13,1	ab
Keskiarvon keskivirhe		0,7	2,4	1,6		1,5		2,1	
P-arvot									
Lajike		0,001	0,92	<0,001		0,71		0,032	
Typpitaso		0,001	0,74	0,001		0,044		0,20	
Lajike * Typpitaso		<0,001	0,70	0,23		0,70		0,009	

Taulukko 11. Sekamallin varianssianalyysin tulokset Ruukin näytteiden SDS-PAGE tuloksille syksyllä 2016. Tilastollisesti merkitsevät erot ($p < 0,05$) on lihavoitu. * merkintä tarkoittaa, että selitettävälle muuttujalle on tehty logaritminmuunnos, minkä vuoksi keskiarvon keskivirheitä ei voida esittää.

Lajike	Tyypitaso kg/ha	75-kDa	41-kDa	19-kDa	14-kDa	21-26-kDa
		%	%	%	%	%
Grindstad	150	8,6	21,5	15,6	14,4	9,5
Grindstad	350	8,1	21,3	18,2	14,6	10,6
Keskimäärin		8,4	21,4	16,9	14,5	10,0
Keskiarvon keskivirhe		0,5	1,0	1,6	1,7	0,8
P-arvot						
Tyypitaso		0,78	0,86	0,36	0,94	0,45

11 Tulosten tarkastelu

11.1 Sääolosuhteet

Kasvukausi 2016 oli molemmilla koepaikoilla hyvin pitkä ja lämpösummaa kertyi vuotta 2015 enemmän, mikä aikaisti kasvustojen niittoa selkeästi vuoteen 2015 verrattuna. Esimerkiksi Maaningalla Nuutin ja Grindstadin kolmas niitto tapahtui kesällä 2016 yhdeksään päivää aikaisemmin kuin vuonna 2015. Ruukissa vastaava ero oli 4–5 päivää. Pitkä lämmin jakso kolmannen niiton jälkeen mahdollisti hyvän kasvun varsinkin korkeimpien tyyppiportaiden kasveilla. Syksyn näytteiden oton alkaessa Maaningalla 18.10.2016 päivänpituus oli 9:35 tuntia ja Ruukissa 21.10.2016 9:05 tuntia. Päivänpituudet ovat timoteilla selvästi karaistumisolosuhteista edistäviä (Larsen 1978). Koepaikkojen syksyn lämpötilojen voidaan myös olettaa olleen karaistumista edistäviä, sillä lokakuun alussa molemmilla koepaikoilla koettiin selvästi syksyn kylmin jakso, jonka aikana keskilämpötilat laskivat alle nollan asteen. Lisäksi molemmilla koepaikoilla karaistumispäivien lukumäärä ennen näytteenottoa oli 28 vuorokautta, mikä on kirjallisuuden perusteella selvästi yli 2–3 viikon karaistumisvaatimuksen (Sakai ja Larcher 1987).

Kevät oli vertailujaksoon 1981–2010 nähden harvinainen, sillä molemmilla koepaikoilla oli vielä pysyvä lumipeite näytteiden oton alkaessa (Maaningalla 2.5.2017 ja Ruukissa 5.5.2017). Päivänpituudet olivat kevään näytteenoton alkaessa pitkiä ja karaistumista purkavia: Maaningalla 16:44 tuntia ja Ruukissa 17:28 tuntia. Maaningalla sääolosuhteet eivät muuttuneet merkittävästi näytteenottoajankohtana 2.–4.5, koeruudut sulivat lähes kokonaan 5.5.2017 mennessä, mutta maa oli vielä osin hyvin jäässä. 5.5.2017 oli näytteenottopäivistä lämpimin, jolloin Maaningalla kerättiin Nuutin ja Grindstadin neljäs kerranne. Kaiken kaikkiaan keväänäytteenoton aikataulu oli optimaalinen; se pystyttiin suorittamaan tiukan aikaikkunan aikana, jolloin timoteikoejäsenet eivät ehtineet selvään kasvuun.

11.2 Kasvuston korkeus, versotiheys ja kuivamassa neliömetrillä

Maaningan syysnäytteissä timotein versojen keskimääräinen korkeus ei eronnut lajikkeiden osalta toisistaan, mikä viittaisi siihen, että Nuutin ja Grindstadin syyskasvurytmi on samankaltainen. Tulos oli myös yllättävä, sillä jälkikasvultaan

nopeamman Grindstadin kolmas niitto tapahtui syksyllä kuusi päivää aikaisemmin kuin Nuutilla, jonka kasvu on Grindstadia hieman huonompaa (Laine ym. 2017). On mahdollista, että kolmannen niiton hetkellä lyhenevä päivänpituus vaikutti jo negatiivisesti syksyn pituuskasvuun, jolloin eroja eri lajikkeiden välille ei syntynyt (Bakken 1992; Bakken ym. 1998). Versojen kuiva-ainepitoisuudessa ei myöskään ollut eroa eri lajikkeiden kesken, mikä tukee teoriaa syyskasvun samalaisuudesta lajikkeiden välillä. Typpitason positiivinen vaikutus versopituuteen oli odotusten mukainen, sillä timotein pituuskasvulla on hyvä vaste typpilannoituksen määrään (Bélanger ja Richards 1997). Parivertailussa erot olivat Maaningalla selviä tasoilla 350- ja 450 kg N/ha, mikä tarkoittaa sitä, että maaperässä on ollut runsaasti kasveille käyttökelpoista reservityppeä myös kolmannen korjuun jälkeen. Ruukissa eroja versopituuksissa ja versojen kuiva-ainesadoissa ei ollut, mikä selittyy osin Ruukin koealueen korkeammalla kokonaistyyppipitoisuudella ja tutkittujen koejäsenten pienellä määrällä.

Maaningalla typpilannoitus lisäsi selvästi versotiheyttä ja typen vaikutus timotein versontaan on ollut useissa tutkimuksissa positiivinen (Langer 1959; Bélanger 1998). Lisäksi timotein kasvurytmi tukee vahvaa syysversontaa (Langer 1957), jota lisää muun muassa lyhenevä päivänpituus (Bakken ym. 1998). Maaningan typpitasolla 450 kg N/ha oli esiintynyt jonkin verran lakoa ennen ensimmäistä niittoa kesällä 2016. Lakoheinä aiheutti ruutuihin aukkoisuutta, mikä saattoi korostaa liikaa mittauskohtien versotiheyksiä, sillä aukkoisuus harventaa eri kasviyksilöiden määrää, mutta lisää yksittäisten timoteiysilöiden versontaa (George ym. 1973). Ruukissa versotiheydet eivät eronneet kahden typpitason kesken, mikä saattaa selittyä maaperän kokonaistypen suurella määrällä.

Syksyllä kolmannen niiton jälkikasvu oli Maaningalla selvästi vahvinta korkeimmilla typpitasoilla, mikä näkyi suurempana versojen kuivamassana neliömetrillä. Typpitaso 450 kg N/ha tuotti lähes kolminkertaisesti enemmän kuiva-ainetta kuin typpitaso 150 kg N/ha. Timoteilla typen syyslisäys vaikuttaa positiivisesti jälkikasvuun talvea vasten (Havstad ja Aamlid 2002). Ruukissa typpitasojen välillä ei ollut eroja, mikä voi selittyä maaperän kokonaistypen suurella määrällä. Keväällä versojen kuivamassat neliömetrillä oli selvästi pienemmät kuin syksyllä, mikä johtuu vanhojen versojen ja lehtien kuolemasta (Duru ja Ducrocq 2000). Kuivamassan väheneminen oli suurinta korkeimmilla typpitasoilla. Maaningalla 450 kg N/ha koejäsenten versojen kuivamassa

väheni syksyyn nähden noin 70 prosenttia. Sheard (1968a) kokeessa edellisen kasvukauden typpilannoitus nosti biomassan määrää seuraavana keväänä.

11.3 Elävien tyvien lukumäärä, kuolleiden tyvien osuus ja niiden kuivapaino

Syysnäytteissä elävien tyvien lukumäärä neliömetrillä nousi selvästi typpilannoituksen myötä Maaningalla. Grant (1971) testasi typpi- ja kaliumlannoituksen vaikutusta tyvisipulien lukumäärään. Hänen tuloksissaan typpi vähensi ja kalium puolestaan lisäsi tyvisipulien lukumäärää. NK-lisäys vaikutti vain vähän tyvisipulien määrään kontrollikasveihin verrattuna. Smith ja Jewiss (1966) havaitsivat typen puolestaan lisäävän timotein tyvien määrää, kun niitosta oli kulunut 14–28 vuorokautta. Tyvien lukumäärään vaikutti tässä kokeessa typen lisäksi myös lämpötila. Keväällä Maaningalla ja Ruukissa elävien tyvien lukumäärä oli pienin suurimmilla typpitasoilla. Tämä voi osin selittyä typen aiheuttamilla talvituholla, mutta myös primääristen tyvien kuolemalla, mikä liittyy timotein kasvurytmiin; vain sekundääri- ja tertiääriversot talvehtivat ja muodostavat kevätsadon (Sheard 1968a).

Nuutilla tyvien keskimääräinen kuivapaino oli selvästi suurempi kuin Grindstadilla, mutta tyvien kuiva-ainepitoisuudessa (%-ka) ja versojen kuivapainossa (g) ei ollut lajikkeen suhteen tilastollisia eroja. Onkin mahdollista, että Nuutin tyvien suurempi koko olisi yleisesti pohjoisille timoteigenotyypeille ominaista, mikä mahdollistaisi suuremman varastoyhdisteiden kerryttämisen talvea vasten (Bakken 1992; Jörgensen ym. 2010). Tyvien kuiva-ainepitoisuudet myös laskivat typpilannoitustason noustessa. Sheard (1968a) mukaan typpilannoitus laski primääristen tyvien painoa, mutta lisäsi sekundääristen ja tertiäärityvien painoa. Grant (1971) puolestaan havaitsi pelkän typpilannoituksen osittain pienentävän tyvien kokoa. Grant (1971) perusteli tätä epäedullisella typpi-kalium-suhteella, jossa typen lisäys johtaa kaliumin puutokseen. Smith ja Jewiss (1966) havaitsivat typen vaikuttavan positiivisesti tyvien kuivapainoon, kun niitosta oli kulunut 14–28 vuorokautta. On todennäköistä, että typpilannoitus lisää nitraattitypen ja muiden typpipitoisten varastoyhdisteiden määrää timotein tyvissä, joiden vaikutus näkyy syksyllä tyvien kuivamassan kasvuna (Sheard 1968a; Sheard 1968b). Keväällä tyvien massat olivat Maaningalla keskimäärin alle 10 prosenttia syksyä pienempiä ja Ruukissa erotus oli hieman yli viisi prosenttia. Tulos on samansuuntainen kuin Sheard (1968a) sekä Emoto ja Ikeda (2005) tutkimuksissa. Näissä tutkimuksissa

kasvustoja ei kuitenkaan niitetty ja tyvisipulien koot oli jaoteltu niiden tyypin (primäärinen, sekundäärinen) mukaan. Tyvien keskimääräisen kuivapainon pientymiseen on syynä ainakin primääristen tyvisipulien osittainen kuolema, sillä ne ovat kuivapainoltaan suurempia kuin sekundääri- tai tertiäärityvisipulit (Sheard 1968a).

11.4 Talvituhot

Talvituhojen esiintymisen kannalta talvi 2016–2017 oli vertailuajanjaksoon 1981–2010 nähden leudompi; marraskuun puolivälissä tapahtunut väliaikainen lämpeneminen vaikutti Maaningalla maaperän routaantumiseen ja niinpä pysyvä lumi satoi lähes roudattomaan maahan. Ruukissa roudan paksuus oli suurempi kuin Maaningalla, joten olosuhteet talvituhoilta olivat myös otollisemmat. Syys-lokakuun vähäinen sademäärä mahdollisesti edisti karaistumista molemmilla koepaikoilla, jolloin kasvien kyky sietää kylmästressiä pitäisi olla korkeimmillaan (Gudleifsson ym. 1986). Maaningalla lajike ei vaikuttanut talvituhojen suuruuteen, mikä viittaisi karaistumisen onnistumiseen molemmilla lajikkeilla.

Virallisissa lajikekokeissa vuosina 2009–2016 (Laine ym. 2017) talvituhojen määrä Grindstadilla ja Nuutilla vaihteli 2–3 prosentin välillä. Typpiporraskokeessa typen negatiivinen vaikutus talvituhojen määrään oli odotettu tulos, sillä runsas typpilannoitus syyskasvun aikana ylläpitää vegetatiivista kasvua ja lisää nurmiheinien juurenniskan (kruunun) typpipitoisuutta. Typpipitoisuuden kasvu varastosolukoissa taas kasvattaa veden määrää solukoissa (hydraatio), joka lisää muun muassa jäätymisvaurioita (Carroll ja Welton 1939; Stier ja Fei 2008). Tyvien kuiva-ainepitoisuuden lasku (%-ka) typpilannoituksen kasvaessa saattaa olla kytköksissä tähän ilmiöön. Verrattuna Huokuna ja Hiivola (1974) tutkimukseen, tämän tutkielman talvituhot olivat korkeimmilla typpilannoitustasoilla vielä melko maltillisia ja tuloksissa oli myös paljon hajontaa. On todennäköistä, että Ruukissa korkeaan talvituhojen määrään vaikutti vaikeammat talvehtimisolosuhteet. Maaningalla sääolosuhteet talvehtimiselle olivat hyvät ja talvituhojen määrä oli pieni.

11.5 Vesiliukoiset sokerit

Lajike ja typpitaso vaikuttivat liukoisten sokerien määrään tarkastelutavasta riippumatta. Liukoisten sokerien määrä oli syksyllä lähes puolet tyvinäytteiden kuivapainosta, Maaningalla keskimäärin 48 prosenttia ja Ruukissa 41 prosenttia. Sheard (1967) mittasi syksyllä tyvien fruktaanipitoisuudeksi noin 49 prosenttia ja ei-polymerisoituneen fruktaanin osuus kuivapainosta oli vajaa kolme prosenttia. Kylmäkaraistumisessa solukkojen kokonaishiilihydraattimäärä voi nousta 60–70 prosenttiin kuiva-aineessa, josta jopa 60 prosenttia voi olla fruktaaneja (Pollock ja Cairns 1991). Liukoisten sokerien korkea määrä tässä kokeessa tukee teoriaa vahvasta syysakkumulaatiosta, jossa suurin osa varastosokereista on eri kokoisia fruktaaneja (Pollock ja Cairns 1991; Livingston 1991). Fruktaanien kerryttäminen liittyy vahvasti timotein kylmäkaraistumiseen talvea vasten (Hanslin ja Höglind 2009). Koska syksyllä lajikeroja ei ollut, niin voidaan olettaa, että molemmilla lajikkeilla karaistuminen oli hyvin edistynyt.

Syksyllä typpilannoitus vaikutti negatiivisesti liukoisten sokerien pitoisuuteen. Typpilisäyksen negatiivinen vaikutus liukoisiin sokereihin perustuu siihen, että vielä karaistumisen aikana hiiltä käytetään varastoon viennin sijaan enemmän nitraatin pelkistysreaktioihin ja proteiinisynteesiin (Meyer ja Stitt 2001; Loaiza ym. 2016). Typen puute taas yleensä laskee hiilen assimilaation kohteina olevien nielujen kokoa, mikä johtaa korkeampaan liukoisten sokerien pitoisuuteen (Huner ym. 1998). Mahdollisesti tästä johtuen sokeripitoisuudet (mg/g ka) olivat suurimmat 150 kg N/ha koejäsenillä. Sheard (1968a) kokeessa korkea lannoitustaso (280 kg N/ha) vähensi polymerisoituneen fruktaanin konsentraatiota primäärisissä ja sekundäärisissä tyvisipuleissa. Korkealla lannoitustasolla tehtiin tähän peruslannoitukseen nähden myöhempi lisälannoitus syksyllä, jonka määrä oli 112 kg N/ha, mikä on hieman enemmän kuin tämä kokeen korkein kolmannelle sadolle annettu typpimäärä, 90 kg N/ha. Ruukin syysnäytteissä typpitasolla ei ollut tilastollista merkitsevyyttä, mikä voi selittyä maaperän suurella kokonaistypen määrällä.

Keväällä liukoisten sokerien määrä oli korkeampi Nuutilla kuin Grindstadilla, vaikka tyvien kuiva-ainepitoisuuksissa ei ollut tilastollisesti merkitsevää eroa. On mahdollista, että Grindstadilla karaistumisen purkautuminen alkoi aiemmin kuin Nuutilla ja pitkäketjuisten sokerien hajottaminen tapahtui nopeammin (Tronsmo ym. 1993; Larsen

1994; Jørgensen ym. 2010; Østrem ym. 2010). Karaistumisen väliaikainen purkautuminen ja reakkilimaatio syksyn näytteenoton jälkeen on myös mahdollista (Kalberer ym. 2006), sillä erityisesti marraskuussa keskilämpötilat olivat vertailujaksoa selvästi korkeammat. Timotein eteläisillä genotyypeillä karaistuminen myös purkautuu pohjoisia genotyyppijä helpommin (Jørgensen ym. 2010). Matalampi vesiliukoisten sokerien määrä keväällä selittyy aktiivisella soluhengityksellä, jossa sokereita kulutetaan energiaksi (Volaire ja Gandoin 1996) ja karaistumisen osittaisella purkautumisella (Jørgensen ym. 2010; Trischuk ym. 2014). Talven aikana Maaningalla kaksi alhaisinta typpitasoa menettivät liukoisten sokerien määrästä noin 48–55 prosenttia, korkeimmat typpitasot 60–63 prosenttia. Erityisesti nitraattityppi kiihdyttää juurten soluhengitystä, mikä lisää sokerien kulutusta. (Barneix ym. 1984).

Liukoisten sokerien kokonaismäärä timotein tyvissä on tärkeämpi kuin liukoisten sokerien pitoisuus, sillä kokonaismäärä ilmaisee energian määrän, joka kasveilla on käytössään stressitilanteissa (Smith ja Jewiss 1966). Liukoisten sokerien määrä timotein tyvissä (mg/tyvi) oli suurempi Nuutilla, mikä selittyy tyvien suuremmalla kuivapainolla. Tyvikohtaisessa tarkastelussa Maaningan syysnäytteiden liukoisten sokerien määrä kasvoi typpilannoituksen myötä (350 kg N/ha), Ruukissa typpi myös lisäsi tyvien sokerimäärää, vaikka ero ei ollutkaan tilastollisesti merkitsevä. Keväällä erot olivat pienempiä ja Maaningalla typpitasolla 250 kg N/ha sokerien määrä oli suurin. Typpi vaikuttaa positiivisesti yhteyttämistuotteiden määrään, sillä esimerkiksi suurempi lehtipinta-ala mahdollistaa korkeamman nettofotosynteesin määrään (Engels ja Marschner 1995), jolloin myös varastosokereiden määrä kasviyksilöä kohti on suurempi. Tässä kokeessa typpi vaikuttaa vielä lannoitusmäärällä 350 kg N/ha positiivisesti liukoisten sokereiden määrään ja todennäköisesti myös kevätkasvuun.

11.6 Tyvien kokonaistyyppi

Tulokset osoittivat, että Maaningalla kokonaistypen määrä timotein tyvissä (mg/tyvi) kasvoi typpitason kasvaessa. Ruukissa muutos ei ollut yhtä suuri. Typpilannoitus lisää muun muassa nitraatin ja aminohappojen määrää varastosolukoissa (Smith ja Jewiss 1966; Gloser 2002; Gloser 2005; Ould-Ahmed ym. 2014). Maaningan lajike-ero johtui mahdollisesti Nuutin suuremmista tyvistä, jotka kerryttivät enemmän muun muassa liukoisia proteiineja kuin Grindstad. Prosentuaalisesti kokonaistypen määrä (%-N) eri

eronnut tilastollisesti merkitsevästi lajikkeiden kesken. Bakken (1992) tutkimuksessa kokonaistypen määrä timotein versoissa oli merkitsevästi pienempi eteläisen genotyypin Grindstadilla (63°29' N) kuin pohjoisen tyypin Bodinilla (67°30' N). Bodinin versot olivat myös selvästi Grindstadia suurempia, joten kokonaistypen tulokset ovat vastaavia Bakken (1992) kanssa. Keväällä tyvien tyyppipitoisuus oli Maaningalla noin 50 prosenttia suurempi kuin syksyllä ja Ruukissa kasvu oli myös 50 prosentin luokkaa. Tämä viittaisi siihen, että karaistumista edistävästä olosuhteista huolimatta typen mobilisaatio nimenomaan lehdistä on ollut nopeaa vielä syksyn näytteenoton jälkeen. Lyhyt päivänpituus ja alhainen lämpötila lisäävät kuljetusta kuolevasta lehtimateriaalista, jota tapahtuu myös lähelle nollalämpötiloja (Chapin ym. 1990). Tulokset noudattelevat Gloser (2002) tulosta, jossa hietakastikalla tyyppiyhdisteiden määrät varastoelimiissä kasvoivat selvästi syksyn ja talven aikana. Ruukissa kevään laskennallinen kokonaistyyppi neliömetrillä oli pienempi kuin Maaningalla, mikä johtuu versojen suuresta kuolleisuudesta talven aikana.

11.7 Liukoiset proteiinit

Syksyllä tyvien liukoisten proteiinien määrään vaikutti Maaningalla sekä lajike, että tyyppilannoitus. Nuutin proteiinimäärä tyveä kohti oli yli 25 prosenttia suurempi kuin Grindstadilla. Nuutin korkeampi liukoisten proteiinien määrä tyveä kohti on samansuuntainen kuin Bakken (1992) tutkimuksessa, vaikkakin lajikkeiden ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä. Tyyppiyhdisteiden hajotus ja varastointi ei mahdollisesti ollut syksyn näytteenoton aikaan edennyt loppuun saakka. Kirjallisuuden perusteella on todennäköistä, että Rubiscon hajottaminen ja synteesi muiksi aminohapoiksi oli tuolloin kesken. Tällöin tyyppivaikutus saattaa syksyllä selittyä osaksi rubiscon suuremmalla määrällä korkeiden tyyppiportaiden kasveissa.

Keväällä liukoisten proteiinien pitoisuus oli yli kolminkertainen syksyyn verrattuna Maaningalla, Ruukissa 2,6-kertainen. Korkeammat proteiinipitoisuudet viittaavat vahvasti siihen, että varastoon vienti on ollut timoteilla kesken vielä syksyn näytteenoton aikana ja, että tyypeä on syntetisoitu aktiivisesti uusiksi liukoisiksi proteiineiksi vielä alkutalven aikana. Liukoisten proteiinien kerryttäminen liittyy monilla kasveilla myös kylmäkaraistumiseen (Millard ym. 2007). Karaistuneella vehnällä on havaittu liukoisten proteiinien kerryttämistä (Trunova 1982) ja Gloser (2002) havaitsi selvän kausittaisen

vaihtelun liukoisten proteiinien määrässä hietakastikan version tyvissä. Typen lisäys nosti merkittävästi liukoisten proteiinien määrää ja kertymistä tyviin. Kerryttäminen ajoittui kokeessa syksyyn. Englanninraiheinällä versojen lehtituppien liukoisten proteiinien pitoisuus (mg/g) oli suurempi typpilannoitusta lisättäessä ja proteiinien varastointi ajoittui myös syksyyn (Louahlia ym. 1999). Aikaisempien tulosten (Sheard 1968b; Bakken 1992; Bakken ym. 1998) perustella on todennäköistä, että myös timotein typpilannoitus lisää liukoisten proteiinien määrää tyvien varastosolukoissa ja ne hydrolysoituvat nopeasti kevätkasvun alkaessa (Louahlia ym. 1999; Gloser 2005). On mahdollista, että vegetatiiviset varastoproteiinit (VSP) tukevat kasvua keväällä, kun typen otto maaperästä on vielä heikkoa (Ourry ym. 2001).

11.8 SDS-PAGE

Tyvinäytteistä tehdyn geelielektroforeesin tavoitteena oli tutkia polypeptidiketjuja, joiden osuus geelien kokonaisintensiteetistä on niin korkea, että ne voisivat toimia mahdollisina vegetatiivisina varastoproteiineina (Staswick 1990). Vegetatiivisten varastoproteiinien yksilöllinen tunnistus perustuu polypeptidiketjujen koon ja varauksen erottelun lisäksi immunoblottaukseen tietyllä vasta-aineella. Peltoviljelykasveista soijapapu on ainut, jolta VS-proteiineja on löydetty kasvien versoista (Staswick 1988), sillä yleensä ne esiintyvät kasvien muissa varastoelimissä, kuten juurissa ja rönkyissä. Tähän mennessä nurmiheiniltä ei ole löydetty VS-proteiineja, jotka täyttäisivät niille annetut määrittymiset (ks. luku 7).

Tässä tutkimuksessa ei pystytty määrittämään mahdollisten VS-proteiinien osuutta liukoisten varastoproteiinien kokonaismäärää yksiselitteisesti, mutta tulosten avulla pystytään arvioimaan, mitkä polypeptidiketjut olisivat fraktion %-osuuden puolesta mahdollisen jatkotutkimuksen arvoisia. Maaningan geelijaissa polypeptidiketjut 75, 19 ja -14-kDa erosivat typpitasojen suhteen toisistaan. Lisäksi ketjujen 21–26-kDa kokonaisintensiteetit erosivat lajike- ja kasvuolosuhteiden suhteen. 14-kDa intensiteetti kasvoi Maaningalla tasaisesti typpilannoituksen myötä, minkä vuoksi on mahdollista, että kyseinen polypeptidiketju on Rubisco-entsyymin pieni alayksikkö (Bovet ym. 1995). 19-kDa oli muihin tutkittuihin ketjuihin nähden poikkeuksellinen, koska sen intensiteetti laski typpilannoituksen myötä. Hon ym. (1994) löysivät kylmäkaraistuneen syysrukiin lehdistä

useita AF-proteiineja, joilla havaittiin olevan selkeä ehkäisevä vaikutus solujen jäänmuodostukseen. 19-kDa oli yksi näistä proteiineista.

75-kDa on muun muassa ohralta löydetty dehydriini, jonka määrä korreloi kylmänkestävyyden kanssa (Kosová ym. 2011). Dehydriinit ja AF-proteiinit liittyvät kylmänkaraistumiseen monilla kasveilla, mutta niiden rooleja varsinaisina varastoproteiineina ei ole kuitenkaan tiettävästi selvitetty. AF-proteiinit kertyivät pääasiassa solujen apoplastiin, joten varsinaisina VS-proteiineina niitä ei perinteisen määritelmän mukaan voi pitää (Staswick 1990). Lisäksi typen rooli näiden proteiinien kerryttämisessä on epäselvä. 21–26-kDa polypeptidiketjujen intensiteetti erosi lajikkeiden välillä; Grindstadilla intensiteetin osuus oli keskimäärin 14,4 prosenttia, Nuutilla 11,8 prosenttia. Gatschet ym. (1994) sormiheinällä tehdyissä tutkimuksissa kylmäkaraistuminen lisäsi 20–26-kDa polypeptidiketjujen synteisiä enemmän kylmänkestävämmässä Midiron-lajikkeessa kuin kylmälle herkässä verrokkilajikkeessa Tifgreen. Tässä mielessä tulos olisi timoteilajikkeiden osalta päinvastainen tai lajikerot selittyvät muista syistä. 41-kDa on mahdollinen VSP, jota on tukittu hietakastikan rönseyistä (Kavanová ja Gloser 2005). Kyseisessä kokeessa proteiinifraktion %-osuus oli kuitenkin pieni (5 %), minkä vuoksi kriteerit VSP:lle eivät täyttyneet.

12 Johtopäätökset

Koevuonna 2016 typpilannoitus selvästi lisäsi syyskasvua ja vaikutus 3. niiton jälkeiseen versontaan oli positiivinen. Vastaavasti typpi lisäsi talvituhojen määrää, mutta tuhojen suuruus oli kuitenkin Maaningalla pieni. Yleisesti talvituhojen määrään vaikutti todennäköisesti myös koepaikkojen erilaiset sääolosuhteet; Ruukissa talvituhojen määrä olikin selvästi korkeampi. Typellä oli selvä vaikutus lähes kaikkiin mitattuihin kasvustomuuttujiin (versotiheys, versopituus, versojen kuivapaino per neliömetri, tyvien kuivapaino) Maaningalla ja erittäin positiivisena tuloksena voidaan pitää sitä, että typpilannoituksen määrä ei vaikuttanut merkitsevästi elävien timotein tyvien määrään keväällä, eikä siten vähentänyt satokomponenttien määrää ja kevätkasvua. Tyvien kuivapaino oli Nuutilla Grindstadia suurempi syys- ja kevätnäytteissä. Tämä saattaa olla lajikekohtainen ominaisuus, joka mahdollistaa suuremman varastokapasiteetin talvehtimista varten. Typpi vaikutti syksyllä positiivisesti tyvien kokoon, mikä oli odotettu tulos.

Liukoisten sokerien pitoisuus oli syysnäytteissä molemmilla lajikkeilla suuri, mikä viittaisi onnistuneeseen karaistumiseen. Lajikkeiden väliset erot tulivat esiin keväällä, jolloin Nuutti oli kuluttanut vähemmän sokereitaan metaboliaan talven aikana. On mahdollista, että karaistuminen on purkaantunut Grindstadilla aikaisemmin tai väliaikaisesti loppusyksyn aikana. Ruukin sokeripitoisuudet olivat Maaninkaa alhaisemmat, vaikutus voi selittyä 3. niiton myöhemmällä ajankohdalla tai syksyn kasvuolosuhteilla yleisesti. Sokerien kokonaismäärän tarkastelu kasviyksilöiden näkökulmasta on talvehtimisen ja kevätkasvun kannalta oleellista. Tyvikohtaisessa tarkastelussa liukoisten sokerien määrä kasvoi typpilannoituksen myötä, mikä tarkoittaa myös absoluuttisesti suurempia energiavarastoja talvelle sekä keväälle.

Typpianalyseissä kokonaistypen prosentuaalinen osuus ei eronnut lajikkeiden välillä, mutta kokonaismäärä tyvissä oli suurempi Nuutilla kuin Grindstadilla, johtuen Nuutin tyvien suuremmasta koosta. Typpilannoitus lisäsi odotusten mukaisesti typen pitoisuutta ja kokonaismäärää tyvissä, mikä liittyy vahvaan syyskasvuun ja typen varastoon vientiin kuolevasta lehtimateriaalista. Liukoisten proteiinien määrä puolestaan oli Nuutilla suurempi ja viitteitä kausittaiseen kerryttämiseen on olemassa tämän tutkielman ja aiemman kirjallisuuden perusteella. Liukoisten proteiinien vaikutusta kevätkasvuun ei pystytty selvittämään, mutta on todennäköistä, että suurempi liukoisten proteiinien määrä tukee kevätkasvua. Vapaiden aminohappojen ja nitraatin pitoisuuksien selvittäminen timotein tyvissä liukoisten proteiinien lisäksi olisi mahdollisissa jatkotutkimuksissa tärkeää.

Syksyn näytteistä tehdyn geelielektroforeesin tulosten perustella ei voitu määrittää mahdollisia vegetatiivisia varastoproteiineja ja nurmiheiniltä niitä ei ole vielä tähän mennessä löydetty. Rubisco muodostaa kasvukauden aikana suuren osan versojen ja lehtien liukoisten proteiinien varastosta, minkä vuoksi on mahdollista, että näytteenottohetkellä laajamittaista VSP-synteesiä ei ole vielä tapahtunut. Tosin osa löydetyistä VS-proteiineista liittyy kylmäkaraistumiseen niiden entsyymien kaltaisten vaikutusten vuoksi. Typen rooli näiden proteiinien kerryttämiseen on epäselvä. Tulevaisuudessa VSP-määrittäminen vaadittaisiin koejärjestely, jossa mahdollisten VS-proteiinien mobilisaatio voidaan todeta varastosolukosta, esimerkiksi ennen kevätkasvua ja sen jälkeen.

13 Kiitokset

Lämpimät kiitokset MMT Mervi Seppäselle ja MMT Perttu Virkajärvelle kannustavasta otteesta työn ohjauksessa. Lisäksi suuret kiitokset kaikille LUKE Maaningan ja Ruukin työntekijöille, jotka ovat olleet mukana ohjauksessa ja tutkielman koejärjestelyissä. Tilastoanalyysissä auttamisesta lämmin kiitos tutkija Maarit Hyrkkäälle. Erikoiskiitokset myös Yara Hanninghof-tutkimusaseman analyttisen kemian asiantuntija Petra Junklewitzille, joka hoiti tehokkaasti yhteydenpitoa Kielin yliopistoon ja vastasi analyysien toimittamisesta. Lopuksi kiitos Yara Suomi Oy:lle työn tukemisesta.

14 Lähteet

- Alamillo, J., Almoguera, C., Bartels, D. & Jordano, J. 1995. Constitutive expression of small heat shock proteins in vegetative tissues of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Molecular Biology* 29: 1093–1099.
- Améziane, R., Cassan, L., Dufossé, C., Rufty, T & Limami, A. 1997. Phosphate availability in combination with nitrate availability affects root yield and chicon yield and quality of Belgian endive (*Cichorium intybus*). *Plant and Soil* 191: 269–277.
- Ariizumi, T., Amagai, M., Shibata, D., Hatakeyama, K., Watanabe, M. & Toriyama, K. 2002. Comparative study of promoter activity of three anther-specific genes encoding lipid transfer protein, xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and polygalacturonase in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 21: 90–96.
- Ashikaga, K., Tanaka, T., Fujii, H., Deguchi, K. & Iida, K. 2012. Evaluating the genotype x nitrogen fertilization interaction on the nutritive value of the crop in timothy (*Phleum pratense* L.) clones. *Grassland Science* 58: 37–41.
- Avie, J-C., Le Dily, F., Goulas, E., Noquet, C., Meuriot, F., Volenec, J., Cunningham, S., Sors, T., Dhont, C., Castonguay, Y., Nadeau, P., Belanger, G. & Chalifour, F-P. 2003. Vegetative storage proteins in overwintering storage organs of forage legumes: roles and regulation. *Canadian Journal of Botany* 81: 1198–1212.
- Avie, J-C., Ourry, A., Lemaire, G., Volenec, J. & Boucaud, J. 1997. Root protein and vegetative storage protein are key organic nutrients for alfalfa shoot regrowth. *Crop Science* 37: 1187–1193.
- Avie, J-C., Ourry, A., Volenec, J., Lemaire, G. & Boucaud, J. 1996. Defoliation-induced changes in abundance and immunolocalization of vegetative storage proteins in taproots of *Medicago sativa*. *Plant Physiology and Biochemistry* 34: 561–570.
- Bae, M., Cho, E., Choi, E-Y. & Park, O. 2003. Analysis of the *Arabidopsis* nuclear proteome and its response to cold stress. *Plant Journal* 36: 652–663.
- Bakken, A. 1992. Effect of daylength on the nitrogen status of timothy (*Phleum pratense* L.) *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science* 42: 62–68.

- Bakken, A., Macduff, J. & Collison, M. 1998. Dynamics of nitrogen remobilization in defoliated *Phleum pratense* and *Festuca pratensis* under short and long photoperiods. *Physiologia Plantarum* 103: 426–436.
- Barneix, A., Breteler, H. & van de Geijn, S. 1984. Gas and ion exchanges in wheat roots after nitrogen supply. *Physiologia Plantarum* 61: 357–362.
- Barnes, R. & Nelson, C. 2003. Forages and grasslands in a changing world. Teoksessa: Barnes, R., Nelson, J., Collins, M. & Moore, K. (toim.), Forages, and introduction to grassland agriculture. 6. painos. A Blackwell Publishing company. s. 3–23.
- Beck, E., Fettig, S., Knake, C., Hartig, K. & Bhattarai, T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of biosciences* 32: 501–510
- Bélanger, G. 1998. Morphogenetic characteristics of timothy grown with varying N nutrition. *Canadian Journal of Plant Science* 78: 103–108.
- Bélanger, G. & Richards, J. 1997. Growth analysis of timothy grown with varying N nutrition. *Canadian Journal of Plant Science* 77: 373–380.
- Below, F. 2002. Nitrogen metabolism and crop productivity. Teoksessa: Pessarakli, M. (toim.). Handbook of plant and crop physiology. New York, USA: Marcel Dekker. s. 385–406.
- Berg, C., McElroy, A. & Kunelius H. 1996. Timothy. Teoksessa: Moser, L., Buxton, D. & Caster, M. (toim.). Cool-season forage grasses (number 34 in the series Agronomy). Madison, USA: American Society of Agronomy. s. 643–664.
- Bertrand, A., Tremblay, G., Pelletier, S., Castonguay, Y. & Bélanger, G. 2008. Yield and nutritive value of timothy as affected by temperature, photoperiod and time of harvest. *Grass and Forage Science* 63: 421–432.
- Bouchart, V., Macduff, J., Ourry, A., Svenning, M., Gay, A., Simon, J. & Boucaud, J. 1998. Seasonal pattern of accumulation and effects of low temperatures on storage compounds in *Trifolium repens*. *Physiologia Plantarum* 104: 65–74.
- Bovet, L., Müller, M. & Siegenthaler, P. 1995. The 26- and 14-kDa phosphoproteins associated with spinach chloroplast envelope membranes are distinct membrane-bound pools of the light-harvesting complex of photosystem II and of the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase. *Planta* 195: 563–569.
- Bray, E. A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103: 1035–1040.
- Cairns, A. & Pollock, C. 1988a. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. I. Chromatographic characterisation of oligofructans and their labelling patterns following $^{14}\text{CO}_2$ feeding. *New Phytologist* 109: 399–405.
- Cairns, A. & Pollock, C. 1988b. Fructan biosynthesis in excised leaves of *Lolium temulentum* L. II: Changes in fructosyl transferase activity following excision and application of inhibitors of gene expression. *New Phytologist* 109: 407–413.
- Carroll, J. & Welton, F. 1939. Effect of heavy and late applications of nitrogenous fertilizer on the cold resistance of kentucky bluegrass. *Plant Physiology* 14: 297–308.

- Chapin, F., Schulze, E. & Mooney, H. 1990. The ecology and economics of storage in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21: 423–447.
- Chatterton, N., Harrison, P., Bennett, J. & Asay, K. 1989. Carbohydrate portioning in 185 accessions of gramineae grown under warm and cool temperature. *Journal of Plant Physiology* 134: 169–179.
- Clarkson D., Hopper M. & Jones L. 1986. The effect of root temperature on the uptake of nitrogen and the relative size of the root system in *Lolium perenne*. I. Solutions containing both NH_4^+ and NO_3^- . *Plant, Cell and Environment* 9: 535–545.
- Clarkson, D. & Warner, A. 1979. Relationships between root temperature and the transport of ammonium and nitrate ions by Italian and perennial ryegrass (*Lolium multiflorum* and *Lolium perenne*). *Plant Physiology* 64: 557–561.
- Close, T. 1997. Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum* 100: 291–296.
- Corre, N., Ourry, A. & Boucaud, J. 1996. Mobilization of nitrogen reserves during regrowth of defoliated *Trifolium repens* L. and identification of vegetative storage proteins. *Journal of Experimental Botany* 47: 1111–1118.
- Crosatti, C., Rizza, F. & Cattivelli, L. 1994. Accumulation and characterization of the 75 kDa protein induced by low temperature in barley. *Plant Science* 97: 39–46.
- Cunningham, S. & Volenec, J. 1998. Seasonal carbohydrate and nitrogen metabolism in roots of contrasting alfalfa (*Medicago sativa* L.) cultivars. *Journal of Plant Physiology* 153: 220–225.
- Cyr, D. & Bewley, J. 1989. Carbon and nitrogen reserves of leafy spurge (*Euphorbia esula*) roots as related to overwintering strategy. *Physiologia Plantarum* 77: 67–72.
- Cyr, D. & Bewley, J. 1990. Proteins in the roots of the perennial weeds chicory (*Cichorium intybus* L.) and dandelion (*Taraxacum officinale* Weber) are associated with overwintering. *Planta* 182: 370–374.
- Dairyland Laboratories. 2018. <https://www.dairylandlabs.com/feed-and-forage/understanding-your-results/wsc-water-soluble-carbohydrates.WSC> (Water soluble carbohydrates). Viitattu 10.4.2018.
- Damerval, C., De Vienne, D., Zivy, M. & Thiellement, H. 1986. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis* 7: 52–54.
- Darwinkel, A. 1975. Aspects of assimilation and accumulation of nitrate in some cultivated plants. <http://edepot.wur.nl/199004>. Centre for Agricultural Publishing and Documentation, Wageningen. 71 s.
- Delrot, S., Atanassova, R. & Maurousset, L. 2000. Regulation of sugar, amino acid and peptide plant membrane transporters. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* 1465: 281–306.

- Delrot, S., Rochat, C., Tegeder, M. & Frommer, W. 2001. Amino acid transport. Teoksessa: Lea, P. & Morot-Gaudry, J-F. (toim.). Plant Nitrogen. Berlin, Germany: Springer. s. 213–236.
- Dionne, J., Castonguay, Y., Nadeau, P. & Desjardins, Y. 2001. Amino acid and protein changes during cold acclimation of green-type annual bluegrass (L.) ecotypes. Crop Science 41: 1862–1870.
- Duru, M. & Ducrocq, H. 2000. Growth and senescence of the successive grass leaves on a tiller. Ontogenic development and effect of temperature. Annals of Botany 85: 635–643.
- Emoto, T. & Ikeda, H. 2005. Appearance and development of tillers in herbage grass species 2. Timothy (*Phleum pratense* L.). Japanese Society of Grassland Science 51: 45–54.
- Engels, C. & Marschner, H. 1995. Plant uptake and utilization of nitrogen. Teoksessa: Bacon, P. (toim.). Nitrogen fertilization in the environment. 1. painos. New York: Dekker. s. 44–81.
- Evans, J. 1989. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants. Oecologia 78: 9–19.
- Fowler, D., Breton, G., Limin, A., Mahfoozi, S. & Sarhan, F. 2001. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature metabolome of Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 127: 1676–1681.
- Foyer, C. 1990. The effect of sucrose and mannose on cytoplasmic protein phosphorylation, sucrose phosphate synthetase activity and photosynthesis in leaf protoplasts from spinach. Plant Physiology and Biochemistry 28: 151–160.
- Frank, K., Crum, J., Calhoun, R. & O'Reilly, K. 2006. The fate of nitrogen applied to a mature kentucky bluegrass turf. Crop Science 46: 209–215.
- Gana, J., Kalengamaliro, N., Cunningham, S. & Volenec, J. 1998. Expression of β -amylase from alfalfa taproots. Plant Physiology 118: 1495–1506.
- Gastal, F. & Durand, J-I. 2000. Effects of nitrogen and water supply on N and C fluxes and partitioning in defoliated swards. Teoksessa: Lemaire, G., Hodgson, J., Moraes, A., Cavalho, P. & Nabinger, C. (toim.). Grassland Ecophysiology and Grazing Ecology. Wallingford, UK: CABI Publishing. s. 15–39.
- Gatschet, M., Taliaferro, C., Anderson, J. & Porter, D. 1994. Cold acclimation and alterations in protein synthesis in bermudagrass crowns. Journal of the American Society for Horticultural Science 119: 477–480.
- George, J., Rhykerd, C., Noller, C., Dillon, J. & Burns, J. 1973. Effect of N fertilization on dry matter yield, total-N, N recovery, and nitrate-N concentration of three cool-season forage grass species. Agronomy Journal 65: 211–216.
- Gloser, V. 2002. Seasonal changes of nitrogen storage compounds in a rhizomatous grass *Calamagrostis epigejos*. Biologia Plantarum 45: 563–568.

- Gloser, V. 2005. The consequences of lower nitrogen availability in autumn for internal nitrogen reserves and spring growth of *Calamagrostis epigejos*. *Plant Ecology* 179: 119–126.
- Goldschmidt, E. & Huber, S. 1992. Regulation of photosynthesis by end-product accumulation in leaves of plants storing starch, sucrose, and hexose sugars. *Plant Physiology* 99: 1443–1448.
- Goulas, E., Richard-Molard, C., Le Dily, F., Le Dantec, C., Ozouf, J. & Ourry, A. 2007. A cytosolic vegetative storage protein (TrVSP) from white clover is encoded by a cold-inducible gene. *Physiologia Plantarum* 129: 567–577.
- Gozzo, F. 2003. Systematic acquired resistance in crop protection: from nature to a chemical approach. *Journal of agricultural and food chemistry* 51: 4487–4503.
- Grant, E. 1971. Effect of nitrogen, potassium and stage of harvesting on haplocorm formation and persistence of timothy. *Canadian Journal of Plant Science* 51: 68–70.
- Gray, G., Chauvin, L., Sarhan, F. & Huner, N. 1997. Cold acclimation and freezing tolerance. A complex interaction of light and temperature. *Plant Physiology* 114: 467–474.
- Griffith, M. & Antikainen, M. 1996. Extracellular ice formation in freezing-tolerant plants. *Advances in low-temperature biology* 3: 107–139.
- Griffith, M. & Yaish, M. 2004. Antifreeze proteins in overwintering plants: a tale of two activities. *Trends in plant science* 9: 399–405.
- Grotelueschen, R. & Smith, D. 1968. Carbohydrates in grasses. III. Estimations of the degree of polymerization of the fructans in the stem bases of timothy and brome grass near seed maturity. *Crop Science* 8: 210–212.
- Gudleifsson, B., Andrews, C. & Bjornsson, H. 1986. Cold hardiness and ice tolerance of pasture grasses grown and tested in controlled environments. *Canadian Journal of Plant Science* 66: 601–608.
- Guy, C. 1999. Molecular responses of plants to cold shock and cold acclimation. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1: 231–242.
- Halling, M. 1988. Growth of timothy and red clover in relation to weather and time of autumn cutting. 2. Storage carbohydrates in autumn and spring. *Swedish Journal of Agricultural Research* 18: 161–170.
- Hanslin, H. & Höglind, M. 2009. Differences in winter-hardening between phenotypes of *Lolium perenne* with contrasting water-soluble carbohydrate concentrations. *Grass and Forage Science* 64: 187–195.
- Havstad, L. & Aamlid, T. 2002. Use of regrowth for forage in crops of timothy (*Phleum pratense* L.) cv. Grindstad grown for seed in Norway. *Grass and Forage Science* 57: 147–156.
- Hawkesford, M., Horst, W., Kichley, T., Lambers, H., Schjoerring, J., Skrumsager, I. & White, P. 2012. Functions of macronutrients. Teoksessa: Marschner, P. (toim.) *Mineral nutrition of higher plants*. 3. Painos. Oxford, UK: Academic Press. s. 135–190.

- Hay, R. 1990. The influence of photoperiod on the dry-matter production of grasses and cereals. *New Phytologist* 116: 233–254.
- Heide, O. 1982. Effects of photoperiod and temperature on growth and flowering in Norwegian and British timothy cultivars (*Phleum pratense* L.). *Acta Agriculturae Scandinavica* 32: 241–252.
- Heide, O. 1994. Control of flowering and reproduction in temperate grasses. *New Phytologist* 128: 347–362.
- Hendershot, K. & Volenec, J. 1993. Nitrogen pools in taproots of *Medicago sativa* L. after defoliation. *Journal of Plant Physiology* 141: 129–135.
- Hendry, G. 1993. Evolutionary origins and natural functions of fructans – a climatological, biogeographic and mechanistic appraisal. *New Phytologist* 123: 3–14.
- Hirel, B. & Gallais, A. 2006. Rubisco synthesis, turnover and degradation: some new thoughts on an old problem. *New Phytologist* 169: 445–458.
- Höglind, M., Hanslin, H. & Van Oijen, M. 2005. Timothy regrowth, tillering and leaf area dynamics following spring harvest at two growth stages. *Field Crops Research* 93: 51–63.
- Höglind, M., Schapendonk, A. & Van Oijen, M. 2001. Timothy growth in Scandinavia: combining quantitative information and simulation modelling. *New Phytologist* 151: 355–367.
- Hon, W-C., Griffith, M., Chong, P. & Yang, D. 1994. Extraction and isolation of antifreeze proteins from Winter Rye (*Secale cereale* L.) Leaves. *Plant Physiology* 104: 971–980.
- Houde, M., Dhindsa, R. S. & Sarhan, F. 1992. A molecular marker to select for freezing tolerance in Gramineae. *Molecular and General Genetics* 234: 43–48.
- Housley, T. & Pollock, C. 1985. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in detached leaves of *Lolium Temulentum* L. *New Phytologist* 99: 499–507.
- Hughes, S., Schart V., Malcolmson, J., Hogarth K., Martynowicz D. & Tralman-Baker, E. 2013. The importance of size and disorder in the cryoprotective effects of dehydrins. *Plant Physiology* 163: 1376–1386.
- Huner, N., Öquist, G. & Sarhan, F. 1998. Energy balance and acclimation to light and cold. *Trends in Plant Science* 3: 224–230.
- Huokuna, E. & Hiivola, S. 1974. The effect of heavy nitrogen fertilization on sward density and winter survival of grasses. *Annales Agriculturae Fenniae* 13: 88–95.
- Ilmatieteen laitos 2017a. <http://ilmatieteenlaitos.fi/kasvukausi-2017>. Terminen kasvukausi 2017. Viitattu 7.5.2018.
- Ilmatieteen laitos 2017b. <http://ilmatieteenlaitos.fi/talvi-2016-2017>. Talven 2016–2017 sää. Viitattu 7.5.2018.
- Ilmatieteen laitos 2018a. <http://ilmatieteenlaitos.fi/syysytilastot>. Syysään tilastoja. Viitattu 7.5.2018.

- Ingram, J. & Bartels, D. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 47: s. 377–403.
- Jørgensen, M., Østrem, L. & Höglind, M. 2010. De-hardening in contrasting cultivars of timothy and perennial ryegrass during winter and spring. *Grass and Forage Science* 65: 38–48.
- Junttila, O. & Kaurin, Å. 1990. Environmental control of cold acclimation in *Salix pentandra*. *Scandinavian Journal of Forest Research* 5: 195–204.
- Kalberer, S., Wisniewski, M. & Arora, R. 2006. Deacclimation and reacclimation of cold-hardy plants: Current understanding and emerging concepts. *Plant Science* 171: 3–16.
- Kavanová, M. & Gloser, V. 2005. The use of internal nitrogen stores in the rhizomatous Grass *Calamagrostis epigejos* during regrowth after defoliation. *Annals of Botany* 95: 457–463.
- Knight, H., Trewavas, A. & Knight, M. 1996. Cold calcium signalling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after accumulation. *Plant Cell* 8: s.489–503.
- Kosová, K., Vitamvas, P., Prasil, I. & Renault, J. 2011. Plant proteome changes under abiotic stress--contribution of proteomics studies to understand plant stress response. *Journal of Proteomics* 74: 1301–1322.
- Kvalbein, A. & Aamlid, T. 2012. Impact of mowing height and late autumn fertilization on winter survival and spring performance of golf greens in the Nordic countries. *Acta Agriculturae Scandinavia, Section B – Soil & Plant Science* 62: 122–129.
- Laine, A., Högnäsbacka, M., Niskanen, M., Ohralahti, K., & uhiainen, L., Kaseva, J. & Nikander, H. 2017. Virallisten lajikekokeiden tulokset 2009-2016. Luonnonvara- ja biotalouden tutkimus 1/2017. s. 243–253.
- Langer, R. 1957. Growth and nutrition of timothy (*Phleum pratense*). *Annals of Applied Biology* 45: 528–541.
- Langer, R. 1959. Growth and nutrition of timothy (*Phleum pratense* L.): IV. The effect of nitrogen, phosphorus and potassium supply in growth during the first year. *Annals of Applied Biology* 47: 211–221.
- Larsen, A. 1978. Freezing tolerance in grasses. Methods for testing in controlled environments. Ås: Norges landbrukshøgskole. 56 s.
- Larsen, A. 1994. Breeding winter hardy grasses. *Euphytica* 77: 231–237.
- Lawrence, S., Greenwood, J., Korhnak, T. & Davis, J. 1997. A vegetative storage protein homolog is expressed in the growing shoot apex of hybrid poplar. *Planta* 203: 237–244.
- Lemettinen, J.-P., Virkajärvi, P., Pakarinen, K., Hyrkäs, M. & Manninen, O. 2012. Ominaisuuksien ja perimän yhteys. Teoksessa: Hyrkäs, M. & Virkajärvi, P. (toim.). Nurmen kasvu- ja kehitysprosessit. NURFYS-hankkeen 2006–2011 loppuraportti. MTT Raportti 56. s.73–97.

- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses: Vol. 1, Chilling, freezing and high temperature stresses. 2. PAINOS. New York, USA: Academic Press. 497 s.
- Lewis, D. 1984. Occurrence and distribution of storage carbohydrates in vascular plants. Teoksessa: Lewis, D. (toim.). Storage Carbohydrates in Vascular Plants: Distribution, Physiology and metabolism. Cambridge, UK: University Press. s. 1–52.
- Lin, C. & Thomashow, M. 1992. A cold-regulated Arabidopsis gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. Biochemical and biophysical research communications 183: 1103–1108.
- Livingston, D. 1991. Nonstructural carbohydrate accumulation in winter oat crowns before and during cold hardening. Crop Science 31: 751–755.
- Lloyd, D., Soldat, D. & Stier, J. 2011. Low-temperature nitrogen uptake and use of three cool-season turfgrasses under controlled environments. HortScience 46: 1545–1549.
- Loaiza, P., Balocchi, O. & Bertrand, A. 2016. Carbohydrate and crude protein fractions in perennial ryegrass as affected by defoliation frequency and nitrogen application rate. Grass and Forage Science 72: 556–567.
- Loualhia, S., Macduff, J., Ourry, A., Humphreys, M. & Boucaud, J. 1999. N reserve status affects the dynamics of nitrogen remobilization and mineral nitrogen uptake during recovery from defoliation by contrasting cultivars of *Lolium perenne* from defoliation. New Phytologist 142: 451–462.
- Lubaretz, O. & Nieten, U. 2002. Accumulation of plant small heat-stress proteins in storage organs. Planta 215: 220–228.
- LUKE 2017. <http://stat.luke.fi/satotilasto>. Satotilasto. Viitattu 28.2.2017.
- MacAdam, J. & Nelson, C. 2003. Physiology of forage plants. Teoksessa: Barnes, R. F., Nelson, J. C., Collins, M. & Moore, K. J. (toim.), Forages, and introduction to grassland agriculture. 6. painos. A Blackwell Publishing company. s. 51–70.
- Marentes, E., Griffith, M., Mlynarz, A. & Brush, R. A. 1993. Proteins accumulate in the apoplast of winter rye leaves during cold acclimation. Physiologia Plantarum 87: 499–507.
- Marjanen, H. & Soini, S. 1979. Timotei Pohjois-Suomen nurmikasvina. Teoksessa: Marjanen, H., Soini, S. & Sipola, J. (toim.). Nurmituhoista tuottavaan viljelyyn. s. 6–64.
- Mavi 2018. <http://www.mavi.fi/fi/oppaat-ja-lomakkeet/viljeli&Sivut/Ymp%C3%A4rist%C3%B6korvauksen-sitoumusehdot.aspx>. Ympäristökorvauksen sitoumusehdot. Viitattu 25.2.2018.
- Meuriot, F., Avice, J-C., Decau, M-L., Simon, J-C., Lainé, P., Volenec, J. & Ourry, A. 2003. Accumulation of N reserves and vegetative storage protein (VSP) in taproots of non-nodulated alfalfa (*Medicago sativa* L.) are affected by mineral N availability. Plant Science 165: 709–718.
- Meuriot, F., Noquet, C., Avice, J-C., Volenec, J., Cunningham, S. & Sors, T. 2004. Methyl jasmonate alters N partitioning, N reserve accumulation and induces gene expression of

- a 32 kDa vegetative storage protein which has chitinase activity in *Medicago sativa* taproots. *Physiologia Plantarum* 120: 113–123.
- Meyer, C. & Stitt, M. 2001. Nitrate reduction and signalling. Teoksessa: Lea, P. & Morot-Gaudry, J-F. (toim.). *Plant Nitrogen*. Berlin, Germany: Springer. s. 37–60.
- Millard, P., Sommerkorn, M. & Grelet, G-A. 2007. Environmental change and carbon limitation in trees: a biochemical, ecophysiological and ecosystem appraisal. *New Phytologist* 175: 11–28.
- Miltner, E., Branham, B., Paul, E. & Rieke, P. 1996. Leaching and mass balance of ^{15}N -labeled urea applied to a Kentucky bluegrass turf. *Crop Science* 36: 1427–1433.
- Mino, Y. & Satake, Y. 1978. Protein metabolism in the haplocorm of timothy (*Phleum pratense* L.) after cutting. *Research bulletin of Obihiro University* 10: 911–916.
- Moriyama, M., Abe, J. & Yoshida, M. 2003. Etiolated growth in relation to energy reserves and winter survival in three temperate grasses. *Euphytica* 129: 351–360.
- Morvan-Bertrand, A., Boucaud, J., Le Saos, J. & Prud'homme M-P. 2001. Roles of the fructans from leaf sheaths and from the elongating leaf bases in the regrowth following defoliation of *Lolium perenne* L. *Planta* 213: 109–120.
- Müntz, K. 1998. Deposition of storage proteins. Teoksessa: Soll, J. (toim.). *Protein trafficking in plant cells*. Berlin, Germany: Springer. s. 77–99.
- Nilsen, E. & Orcutt, D. 1996. Low temperature: chilling and freezing. Teoksessa: Nilsen, E. T. & Orcutt, D.M. (toim.). *Physiology of plants under stress. Abiotic factors*. John Wiley & Sons, INC. USA. s. 486–514.
- Nissinen, O. 1996. Analyses of climatic factors affecting snow mould injury in first-year timothy (*Phleum pratense* L.) with special reference to *Sclerotinia borealis*. *Acta Universitatis Oulensis. Scientiae Rerum Naturalium, A* 289. (Väitöskirja).
- O'Kane, D., Gill, V., Boyd P. & Burdon R. 1996 Chilling, oxidative stress and antioxidant responses in '*Arabidopsis thaliana*' callus. *Planta* 198:366–370.
- Ould-Ahmed, M., Decau, M-L., Morvan-Bertrand, A., Prud'homme, M-P., Lafrenière, C. & Drouin, P. 2014. Plant maturity and nitrogen fertilization affected fructan metabolism in harvestable tissues of timothy (*Phleum pratense* L.) *Journal of Plant Physiology* 171: 1479–1490.
- Ourry, A., Macduff, J., Volenec, J. & Gaudillère, J. 2001. Nitrogen traffic during plant growth and development. Teoksessa: Morot-Gaudry, J. & Lea, P. (toim.). *Plant Nitrogen*. Berlin, Germany: Springer. s. 255–273.
- Palva, E. T. 1994. Gene expression under low temperature stress. Teoksessa: Basra, A. S. (toim.), *Stress-induced gene expression in plants*. Harwood Academic Publishers, Langshorne, PA. s. 103–130.
- Pearce, R. & McDonald, I. 1977. Ultrastructural damage due to freezing followed by thawing in shoot meristem and leaf mesophyll cells of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.). *Planta*, 134: 159–168.

- Pearson, C., Volk, R. & Jackson, W. 1981. Daily changes in nitrate influx, efflux and metabolism in maize and pearl millet. *Planta* 152: 319–324.
- Pelletier, S., Tremblay, G., Lafrenière, C., Bertrand, A., Bélanger, G., Castonguay, Y. & Rowsell, J. 2009. Non-structural carbohydrate concentrations in timothy forage as affected by N fertilization, stage of development, and time of cutting. *Agronomy Journal* 101: 1372–1380.
- Pollock, C. 1986. Fructans and the metabolism of sucrose in vascular plants. *New Phytologist* 104: 1–24.
- Pollock, C. & Cairns, A. 1991. Fructan metabolism in grasses and cereals. *Annual review of Plant Physiology and Plant molecular biology* 42: 77–101.
- Pollock, C. & Jones, T. 1979. Seasonal patterns of fructan metabolism in forage grasses. *New Phytologist* 83: 9–15.
- Pollock, C. & Ruggles, P. 1976. Cold-induced fructosan synthesis in leaves of *Dactylis glomerata*. *Phytochemistry* 15: 1643–1646.
- Powles, S. 1984. Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review of Plant Physiology* 35: 15–44.
- Reaney, M., Gusta, L., Abrams, S. & Robertson, A. 1989. The effects of abscisic acid, kinetin and gibberellin on freezing tolerance in smooth brome grass (*Bromus inermis*) cell suspensions. *Canadian journal of botany* 67: 3640–3646.
- Rognli, O. 1987. Genetic variation in arctic populations of timothy (*Phleum pratense* L.): I. Seed production characters. *Heredity* 107: 27–54.
- Sakai, A. & Larcher, W. 1987. Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress. *Ecological Studies* 62, Springer-Verlag, Berlin, 321 s.
- Salo, T., Turtola, E., Virkajärvi, P., Saarijärvi, K., Kuisma, P., Tuomisto, J., Muurinen, S. & Turakainen, M. 2013. Nitrogen fertilizer rates, N balances, and related risk of N leaching in Finnish agriculture. *MTT Report* 102: 21–24.
- Santhanagopalan, I., Basha, E., Ballard, K., Bopp, N. & Vierling, E. 2015. Model chaperones: small heat shock proteins from plants. *Teoksessa: Tanguay, M. & Hightower, E. (toim.). The big book on small heat shock proteins. Cham: Springer. s. 119–153.*
- Seppänen, M., Pakarinen, K., Jokela, V., Andersen, J., Fiil, A., Santanen, A. & Virkajärvi, P. 2010. Vernalization response of *Phleum pratense* and its relationships to stem lignification and floral transition. *Annals of Botany* 5: 697–1707.
- Sheard, R. 1967. Measurement of seasonal variation of fructan in the haplocorm of timothy (*Phleum pratense* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 18: 339–342.
- Sheard, R. 1968a. Influence of defoliation and nitrogen on the development and the fructan composition of the vegetative reproductive system of timothy (*Phleum pratense* L.) *Crop Science* 8: 55–60.
- Sheard, R. 1968b. Relationship of carbohydrate and nitrogen compounds in the haplocorm to the growth of timothy (*Phleum pratense* L.) *Crop Science* 8: 658–660.

- Shewry, P. & Halford, N. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53: 947–958.
- Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses to dehydration and cold stresses. *Annual review of plant biology* 57: 781–803.
- Smith, D. 1972. Carbohydrate reserves of grasses. Teoksessa: Younger, V. & McKell, C. (toim.). *the biology and utilization of grasses*. New York, USA: Academic Press. s. 318–333.
- Smith, D. & Jewiss, O. 1966. Effects of temperature and nitrogen supply on the growth of timothy (*Phleum pratense* L.). *Annals of Applied Biology* 58: 145–157.
- Somogyi, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. *Journal of Biological Chemistry* 160: 61–68.
- Staswick, P. 1988. Soybean vegetative storage protein structure and gene expression. *Plant Physiology* 87: 250–254.
- Staswick, P. 1990. Novel regulation of vegetative storage protein genes. *The Plant Cell* 2: 1–6.
- Stephenson, L., Bunker, T., Dubbs, W. & Grimes, H. 1998. Specific Soybean Lipoygenases Localize to Discrete Subcellular Compartments and Their mRNAs Are Differentially Regulated by Source-Sink Status. *Plant Physiology* 116: 923–933.
- Stier, J. & Fei, S-z. 2008. Cold-stress physiology and management of turfgrasses. Teoksessa: Pessarakli, M. (toim.), *Turfgrass Management and Physiology*. Boca Raton: CRC Press. s.473–506.
- Stressmann, M., Kitao, S., Griffith, M., Moresoli, C., Bravo, L. & Marangoni, A. 2004. Calcium interacts with antifreeze proteins and chitinase from cold-acclimated winter rye (1). *Plant Physiology* 135: 364–376.
- Suzuki, M. 1968. Fructosan in the timothy haplocorm. *Canadian Journal of Botany* 46: 1201–1206.
- Suzuki, M. 1989. Fructans in Forage Grasses with Varying Degrees of Cold hardiness. *Journal of Plant Physiology* 134: 224–231.
- Taiz, L. & Zeiger, E. 2010. *Plant Physiology*. 5. painos. Sinauer Associates, Inc. s. 108–116.
- Thomashow, M. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and plant Molecular Biology* 50: 571–599.
- Thorsteinsson, B., Phil, H. & Chatterton, J. 2002. Fructan and total carbohydrate accumulation in leaves of two cultivars of timothy (*Phleum pratense* Vega and Climax) as affected by temperature. *Journal of Plant physiology* 159: 999–1003.
- Trischuk, R., Schilling, B., Low, N. & Gusta, L. 2014. Cold acclimation, de-acclimation and re-acclimation of spring canola, winter canola and winter wheat: The role of

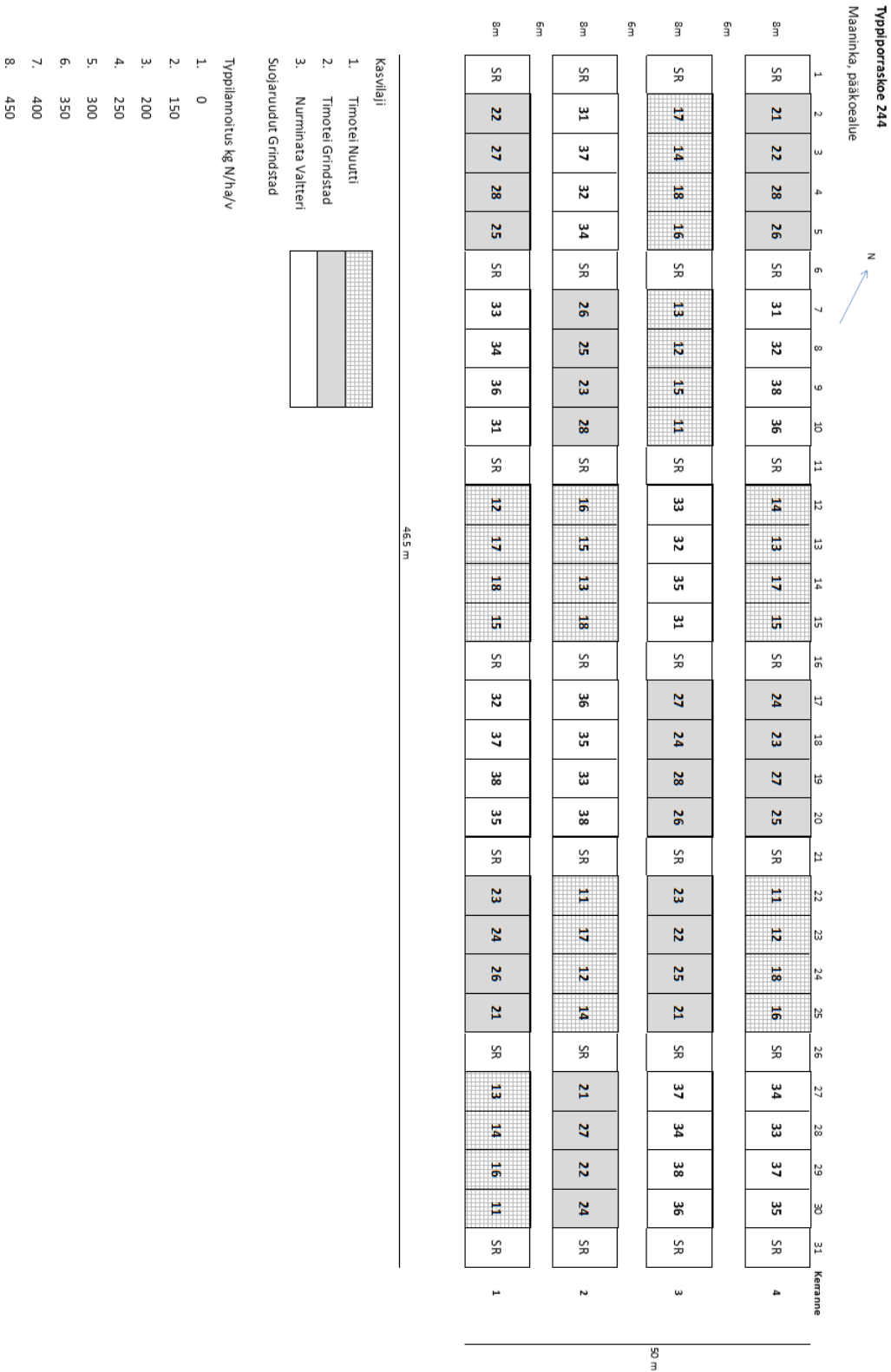
- carbohydrates, cold-induced stress proteins and vernalization. *Environmental and Experimental Botany* 106: 156–163.
- Tronsmo, A., Kobro, G., Morgenlie, S. & Flengsrud, R. 1993. Carbohydrate content and glycosidase activities following cold hardening in two grass species. *Physiologia Plantarum* 88: 689–695.
- Trunova, T. 1982. Mechanism of winter wheat hardening at low temperature. Teoksessa: Li, P. & Sakai, A. (toim.) *Plant cold hardiness and freezing stress: mechanisms and crop implications*. Vol. 2. New York: Academic Press. s. 41–54.
- Virkajärvi, P. & Pakarinen K. 2012. Nurmen kasvuprosessien esittely. Teoksessa: Hyrkäs, M. & Virkajärvi, P. (toim.). *Nurmen kasvu- ja kehitysprosessit. NURFYS-hankkeen 2006–2011 loppuraportti. MTT Raportti* 56. s. 11–21.
- VN 2014. Valtioneuvoston asetus eräiden maa- ja puutarhataloudesta peräisin olevien päästöjen rajoittamisesta. Asetus 1250/2014. Annettu 18.12.2014. Finlex® sähköinen säädöstietopankki: <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2014/20141250>. Viitattu 10.4.2018.
- Volaire, F. 2002. Drought survival, summer dormancy and dehydrin accumulation in contrasting cultivars of *Dactylis glomerata*. *Physiologia Plantarum* 116: 42–51.
- Volaire, F. & Gandoin, J. 1996. The effect of age of the sward on the relationship between water-soluble carbohydrate accumulation and drought survival in two contrasted populations of cocksfoot (*Dactylis glomerata* L.). *Grass and Forage Science* 51: 190–198.
- Volenec, J., Ourry, A. & Joern, B. 1996. A role for nitrogen reserves in forage regrowth and stress tolerance. *Physiologia Plantarum* 97: 185–193.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. & Altman, A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9:244–252.
- Waters, E., Aebermann, B. & Sanders-Reed, Z. 2008. Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns. *Cell Stress Chaperones* 13: 127–142.
- Webster, D. & Ebdon, J. 2005. Effects of nitrogen and potassium fertilization on perennial ryegrass cold tolerance during deacclimation in late winter and early spring. *HortScience* 40: 842–849.
- Wei, J-Z., Chatterton, N., Harrison, P., Wang, R. and Larson, S. 2002. Characterisation of fructan biosynthesis in big bluegrass (*Poa secunda*). *Journal of Plant Physiology* 159: 705–715.
- White, L. 1973. Carbohydrate reserves of grasses: a review. *Journal of Range Management* 26: 13–18.
- Whitehead, D. 1995. *Grassland nitrogen*. Wallingford: CAB International. s. 1–33.
- Wilman, D. 1965. The effect of nitrogenous fertilizer on the rate of growth of Italian ryegrass. *The Journal of the British Grassland Society* 20: 248–254.

- Wisniewski, M., Webb, R., Balsamo, R., Close, T., Yu, X-M. & Griffith, M. 1999. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*). *Physiologia Plantarum* 105: 600–608.
- Yamamoto, S., Lüscher, M., Hochstrasse, U., Boller, T. & Wiemken, A. 2010. Mode of synthesis of long-chain fructan in timothy haplocorm. *Grassland Science* 56: 194–197.
- Yang, Z. & Nevo, E. 2016. Heat shock proteins in wild barley at “evolution canyon” Mount Carmel, Israel. Teoksessa: Asea, A., Calderwood, S. & Kaur, P. (toim.). *Heat Shock Proteins and Plants*. Berlin, Germany: Springer. s. 79–102.
- Yost, H., Petersen, R. & Lindquist, S. 1990. Posttranscriptional regulation of heat shock protein synthesis in *Drosophila*. Teoksessa: Morimoto, R., Tissieres, A. & Georgopoulos, C. (toim.), *Stress proteins in biology and medicine*. CSH Laboratory Press. s. 379–409.
- Yu, X-M., Griffith, M. & Wiseman, S. B. 2001. Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. *Plant physiology* 126: 1232–1240.
- Zörb, C., Schmitt, S., Neeb, A., Karl, S., Linder, M. & Schubert, S. 2004. The biochemical reaction of maize (*Zea mays L.*) to salt stress is characterized by a mitigation of symptoms and not by a specific adaption. *Plant Science* 167: 91–100.
- Østrem, L., Rapacz, M., Jørgensen, M. & Höglind, M. 2010. Impact of frost and plant age on compensatory growth in timothy and perennial ryegrass during winter. *Grass and Forage Science* 65: 15–22.
- Østrem, L., Rapacz, M., Jørgensen, M. & Höglind, M. 2011. Effect of developmental stage on carbohydrate accumulation patterns during winter of timothy and perennial ryegrass. *Acta Agriculturae Scandinavica, Section B — Soil & Plant Science* 61: 153–163.

15 Liitteet

Liite 1.

Maaningan koeaseman typpiporraskokeen koekartta. Koenumerointi + 0 kg N = 11, Timotei + 150 kg N = 12 jne. Koeasetelma *incomplete split-plot* (osaruutukoe + epätäydelliset lohkot)



Ruukin koeaseman typpiporraskokeen koekartta. Koeasetelma *incomplete split-plot* (osaruutukoe + epätäydelliset lohkot)

Ruukki, Kotipelto

Metsän laita

Liite 3.

Maanäyteanalyysin tulokset Maaningan ja Ruukin koeasemilta 6/2014.

Ositteet	Yksiköt	Maaninka Pääkoealue 0-20 cm	Maaninka Pääkoealue 20-40 cm	Ruukki Kotipeltto 0- 20 cm	Ruukki Kotipeltto 20- 40 cm
Maalaji		Karkea hietä (Kht)	Karkea hietä (Kht)	Savinen hienohietä SHht	Savinen hienohietä SHht
Multavuus		m/rm	m/rm	m/rm	m/rm
Johtoluku	10xmS/cm	0,7	0,70	0,85	0,9
Happamuus pH	pH	6,5	6,50	6,3	6,3
Typpi (N) kok.	%	0,15	0,09	0,205	0,185
Kalsium (Ca)	mg/l	1350	975,00	1750	1750
Fosfori (P)	mg/l	15	8,10	18,5	18,5
Kalium (K)	mg/l	125	125,50	120	115
Magnesium (Mg)	mg/l	94,5	92,00	175	185
Rikki (S)	mg/l	6,4	7,35	8,25	9,2
Org. hiili (C)	%	1,565	0,83	3,145	2,715

Liite 4.

Maaningan lannoitustaulukko (N-P-K-S) kasvukaudelle 2016.

Koejäsen	Lannoituskerta	Lannoite		N	P	K	S
150	1	Hivenravinneseos	100	0	0	0	17
		YaraMila NK 2	243	53	0	29	7
		Starttiravinne	105	13	24	0	0
		Kaliumsuola	0	0	0	0	0
	2	YaraMila NK 2	245	54	0	29	7
		Kaliumsuola	0	0	0	0	0
	3	YaraMila NK 2	136	30	0	16	4
		Kaliumsuola	30	0	0	15	0
	Lannoitus yht.			150	24	90	36
250	1	Hivenravinneseos	100	0	0	0	17
		YaraMila NK 2	415	91	0	50	12
		Starttiravinne	155	19	36	0	0
		Kaliumsuola	0	0	0	0	0
	2	YaraMila NK 2	409	90	0	49	12
		Kaliumsuola	0	0	0	0	0
	3	YaraMila NK 2	227	50	0	27	7
		Kaliumsuola	48	0	0	24	0
	Lannoitus yht.			250	36	150	49
350	1	Hivenravinneseos	100	0	0	0	17
		YaraMila NK 2	585	129	0	70	18
		Starttiravinne	210	25	48	0	0
		Kaliumsuola	0	0	0	0	0
	2	YaraMila NK 2	573	126	0	69	17
		Kaliumsuola	0	0	0	0	0
	3	YaraMila NK 2	318	70	0	38	10
		Kaliumsuola	66	0	0	33	0
	Lannoitus yht.			350	48	210	61
450	1	Hivenravinneseos	100	0	0	0	17
		YaraMila NK 2	758	167	0	91	23
		Starttiravinne	260	31	60	0	0
		Kaliumsuola	0	0	0	0	0
	2	YaraMila NK 2	736	162	0	88	22
		Kaliumsuola	0	0	0	0	0
	3	YaraMila NK 2	409	90	0	49	12
		Kaliumsuola	83	0	0	42	0
	Lannoitus yht.			450	60	270	74

Liite 5.

Ruukin lannoitustaulukko (N-P-K-S) kasvukaudelle 2016.

<i>Koejäs en</i>	<i>Lannoituskert a</i>	<i>Lannoite</i>		<i>N</i>	<i>P</i>	<i>K</i>	<i>S</i>
150	1	Hivenravinneseos	100	0	0	0	17
		YaraMila Y4	306	61	6	37	9.2
		Starttiravinne	40	5	9	0	0
		Kaliumsuola	19	0	0	10	0
	2	YaraMila Y4	270	54	5	32	8.1
		Kaliumsuola	38	0	0	19	0
	3	YaraMila Y4	150	30	3	18	4.5
		Kaliumsuola	38	0	0	19	0
	Lannoitus yht.			150	24	135	39
350	1	Hivenravinneseos	100	0	0	0	17
		YaraMila Y4	734	147	15	88	22
		Starttiravinne	60	7	14	0	0
		Kaliumsuola	44	0	0	22	0
	2	YaraMila Y4	630	126	13	76	19
		Kaliumsuola	87	0	0	44	0
	3	YaraMila Y4	350	70	7	42	11
		Kaliumsuola	87	0	0	44	0
	Lannoitus yht.			350	48	315	68

Liite 6.

Liukoisten sokerien (y) ja kokonaistypen sekä liukoisten proteiinien (x) yhteys syksyllä 2016 ja keväällä 2017. Lineaarinen regressioyhtälö, korrelaatiokerroin (r), korrelaatiokertoimen merkitsevyys (P-arvo) ja kertoimen selitysaste (R²).

<i>y</i>	<i>x</i>	<i>Yhtälö</i>	<i>r</i>	<i>P-arvo</i>	<i>R2</i>
WSC (mg g ka) syksy					
Maaninka	N-% ka	y = 0,0571 - 65,62x	-0,76	<0,0001	0,57
Ruukki	N-% ka	y = 0,0441 - 21,52x	-0,06	0,914	0,00
Maaninka	Liuk. Prot. mg g ka	y = 0,0712 - 0,0164x	-0,47	0,010	0,22
Ruukki	Liuk. Prot. mg g ka	y = 0,0729 - 31,75x	-0,33	0,526	0,11
WSC (mg g ka) kevät					
Maaninka	N-% ka	y = 0,027 - 28,09x	-0,39	0,035	0,15
Ruukki	N-% ka	y = 0,0406 - 93,75x	-0,58	0,225	0,34
Maaninka	Liuk. Prot. mg g ka	y = 0,0268 - 15,11x	-0,39	0,037	0,15
Ruukki	Liuk. Prot. mg g ka	y = 31,17 + 4,96x	0,31	0,551	0,10